



PCT/FR 03/03860

REC'D 22 MAR 2004

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 29 DEC. 2003

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800-Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire - DB-540-A-F / 210502

Réservé à l'INPI

REMISE DES REÇUS

DATE 23 DEC 2002

LIEU 75 INPI PARIS B

N° D'ENREGISTREMENT

0216576

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE
PAR L'INPI

23 DEC, 2002

Vos références pour ce dossier

(facultatif) BLO/HLPmlF263/87FR

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

À QUELLE CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet ORES

36 rue de Saint Petersburg

75008-PARIS

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale

N°

Date

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date

Transformation d'une demande de

brevet européen Demande de brevet initiale

☐

N°

Date

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

PROTEINE CHIMERIQUE POUR LE CRIBLAGE D'AGONISTES ET D'ANTAGONISTES DES VOIES DE
SIGNALISATION CELLULAIRES DEPENDANTES DES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒ Personne morale☐ Personne physiqueNom
ou dénomination sociale

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

Prénoms

Forme juridique

Etablissement public

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile-
ou
siège

Rue

Code postal et ville

Pays

31-33 rue de la Fédération

75015 PARIS

FRANCE

Française

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☒ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»Remplir impérativement la 2^{ème} page

| | | |
|---|----------------------|--|
| REMISE EN DÉPÔT 29 DEC 2002 DATE LIEU 75 INPI-PARIS B N° D'ENREGISTREMENT 0216576 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI | | Réservé à l'INPI DB 540 W / 210502 |
| 6 MANDATAIRE (silya.kou) | | |
| Nom | | ORES |
| Prénom | | Béatrice |
| Cabinet ou Société | | CABINET ORES |
| N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel | | |
| Adresse | Rue | 36 rue de Saint Petersburg |
| | Code postal et ville | 75 010 18 PARIS |
| | Pays | FRANCE |
| N° de téléphone (facultatif) | | 01.53.21.11.00 |
| N° de télécopie (facultatif) | | 01.53.21.08.88 |
| Adresse électronique (facultatif) | | ores@cabinet-ores.com |
| 7 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques | | |
| Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes | | <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s) |
| 8 RAPPORT DE RECHERCHE Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) | | |
| Établissement immédiat ou établissement différé | | <input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé |
| Paiement échelonné de la redevance (en deux versements) | | Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non |
| 9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES | | Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG [] [] [] [] [] |
| 10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS | | <input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences |
| Le support électronique de données est joint | | <input type="checkbox"/> |
| La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe | | <input type="checkbox"/> |
| Si vous avez utilisé l'imprimé «Sulte», indiquez le nombre de pages jointes | | 1 |
| 11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Béatrice ORES (n°92-4046) | | VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI M. ROCHET |



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

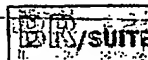
BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1 / 1



| |
|------------------------------------|
| REMISE EN VENTE |
| DATE 28 DEC 2002 |
| LIEU 75 INPI PARIS B |
| N° D'ENREGISTREMENT 0216576 |
| NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI |

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire.

DS 629 3 W / 010702

| | | | |
|---|----------------------|--|--|
| Vos références pour ce dossier (facultatif) | | BLO/HLPmIF263/87FR | |
| <input checked="" type="checkbox"/> DÉCLARATION DE PRIORITÉ | | Pays ou organisation | |
| OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE | | Date | |
| LA DATE DE DÉPÔT D'UNE | | Pays ou organisation | |
| DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE | | Date | |
| | | Pays ou organisation | |
| | | Date | |
| <input checked="" type="checkbox"/> DEMANDÉUR (Cochez l'une des 2 cases) | | <input checked="" type="checkbox"/> Personne morale | |
| | | <input type="checkbox"/> Personne physique | |
| Nom | | INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE | |
| ou dénomination sociale | | | |
| Prénoms | | | |
| Forme juridique | | Etablissement public | |
| N° SIREN | | | |
| Code APE-NAF | | | |
| Domicile ou siège | Rue | 101 rue de Tolbiac | |
| | Code postal et ville | 75013 PARIS | |
| | Pays | FRANCE | |
| Nationalité | | Française | |
| N° de téléphone (facultatif) | | | |
| N° de télécopie (facultatif) | | | |
| Adresse électronique (facultatif) | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> DEMANDÉUR (Cochez l'une des 2 cases) | | <input type="checkbox"/> Personne morale | |
| | | <input type="checkbox"/> Personne physique | |
| Nom | | | |
| ou dénomination sociale | | | |
| Prénoms | | | |
| Forme juridique | | | |
| N° SIREN | | | |
| Code APE-NAF | | | |
| Domicile ou siège | Rue | | |
| | Code postal et ville | | |
| | Pays | | |
| Nationalité | | | |
| N° de téléphone (facultatif) | | | |
| N° de télécopie (facultatif) | | | |
| Adresse électronique (facultatif) | | | |
| SIGNATURE DU DEMANDÉUR | | VISA DE LA PRÉFECTURE | |
| ou son mandataire | | OU DE L'INPI | |
| (Nom et qualité du signataire) | | M. ROCHET | |
| Béatrice ORES (n°92-4046) | | | |

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

La présente invention est relative à une protéine recombinante chimérique dérivée des sous-unités α_1 et β de canaux calciques haut-seuil, ainsi qu'à ses applications pour l'étude des voies de signalisation cellulaires dépendantes des récepteurs-couplés aux protéines G (RCPG) et l'identification de composés modulant

5 l'activité des protéines G.

La classe des RCPG comprend plus de mille membres identifiés, codés par des gènes représentant 2 à 5 % du potentiel de codage du génome de vertébrés (El Far et Betz, *Biochem. J.*, 2002, 365, 329-336) ; on dénombre 27 gènes codant pour des sous-unités $G\alpha$, 5 pour les sous-unités $G\beta$, et 14 pour les sous-unités

10 $G\gamma$, (Albert et Robillard, *Cell*, 2002, 14, 407-418).

De nombreux processus biologiques comme la régulation synaptique, la réponse aux hormones et aux phéromones, le guidage cellulaire (chémoattraction ou chémorépulsion) ou la vision impliquent les récepteurs liés aux protéines G (RCPG). En effet, les RCPG sont capables d'assurer la reconnaissance et

15 la transduction de messages aussi variés que ceux des acides aminés (acide glutamique...), des peptides (angiotensine, neurotensine, somatostatine...), des protéines (thyrotropine (TSH), hormone folliculo-stimulante (FSH)...), des amines (acétylcholine, adrénaline, sérotonine...), des lipides (prostaglandines, leukotriènes...), des nucléotides et des nucléosides (adénosine ou ATP). Les ions

20 (Ca^{++}), les molécules odorantes et gustatives, les photons et les phéromones font également partie des signaux extracellulaires reconnus par les RCPG (pour revue, voir Gether, *Endocrine reviews*, 2000, 21, 90-113 et Albert et Robillard, précités).

Le signal extracellulaire est transduit à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire des protéines G hétérotrimériques liant les nucléotides guanyliques

25 (GDP et GTP), composées des sous-unités nommées $G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$; la reconnaissance du signal extracellulaire par le RCPG entraîne l'activation des protéines G qui se traduit par la dissociation de l'hétérotrimère en $G\alpha$, et $G\beta\gamma$ et la liaison de la sous-unité $G\alpha$ au GTP.

Plusieurs effecteurs intracellulaires peuvent être modulés directe-

30 ment ou indirectement par l'activation des différentes sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$, des protéines-G. Les effecteurs contrôlés par les sous-unités $G\alpha$, peuvent être des

enzymes (phospholipases A2 et C, adénylyl- et guanylylcyclases, c-jun kinase, tyrosine-phosphatase (SH-PTP2)...), dont l'activation va influencer sur le taux de seconds messagers produits ou libérés (phosphoinositides et diacyls-glycérols, Ca^{++} , cAMP, cGMP...), des canaux (à conductances potassiques, calciques, sodiques ou chlores), des échangeurs ioniques (sodium/proton) ou plus récemment des kinases (tyrosines kinases Btk (Bruton's tyrosine kinase), MAP kinases (Mitogen-Activated protein kinase), (Albert et Robillard, précité).

Gβγ peut également moduler l'activité d'effecteurs au moins aussi nombreux que ceux contrôlés par Gα, à savoir : les canaux (à conductances sodique, calcique dépendante du voltage (N et P/Q) ou potassique à rectification entrante (GIRK : G protein inward rectifier K⁺ channel)...), les enzymes dites « classiques » (phospholipases A2 et C, adénylyl cyclase I, II, IV, tyrosine-phosphatase (SH-PTP1)...) ainsi qu'un nombre important de kinases (phosphoinositide 3-kinase, récepteur β-adrénergique kinases, c-jun kinase, MAP kinases, tyrosine kinases Btk et *T-cell-specific kinase* (Tsk), (pour revue voir Albert et Robillard, précité).

Ainsi, l'étude de ces voies de signalisation et la recherche de drogues agissant sur ces voies de signalisation présentent un intérêt thérapeutique important pour la recherche de nouveaux médicaments.

Il ressort de ce qui précède que l'activation des protéines G et leur dissociation en sous-unités Gα et Gβγ est le carrefour d'un grand nombre de voies de signalisation et de régulation cellulaires. Par conséquent, l'analyse de l'activation de ces protéines G permet d'étudier les voies de signalisation cellulaire, dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G et de cribler des agonistes et des antagonistes de ces voies de signalisation.

Pour analyser l'activation des protéines G, Janetopoulos et al., (Science, 2001, 291, 2408-2411) ont décrit une technique de suivi *in vivo* en temps réel de l'interaction Gα-Gβ. Cette technique, mise au point chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*, est basée sur la cotransfection de deux constructions codant pour deux protéines chimères fluorescentes : Gβ-YFP et Gα₂-CFP. L'interaction entre les deux chimères induit un processus de transfert de fluorescence (FRET) qui permet un suivi en temps réel de leur interaction dans le cellule vivante. Les deux chimères construites par Janetopoulos et al. sont capables de former un complexe qui interagit

de manière fonctionnelle avec le récepteur à l'AMPc et peut être activé par du GTP γ S. Cette technique utilisant la fluorescence est adaptable aux approches de criblage à haut débit. Toutefois, du fait de la compétition avec des sous-unités G α ou G $\beta\gamma$ endogènes supprimant le processus de FRET, cette approche ne peut fonctionner que dans des cellules délétées génétiquement de leur protéine G équivalente endogène. De plus, chez les vertébrés, les différents isoformes de protéines G sont impliquées dans la réponse à l'activation des différents récepteurs de type RCPG. En conséquence, l'approche de Janetopoulos et al. suppose la construction d'une chimère et d'une lignée cellulaire spécifiquement délétée pour chaque isotype de protéine G étudié.

Il ressort de ce qui précède qu'il n'existe pas d'outil ubiquitaire, simple à mettre en œuvre pour évaluer l'activation des protéines G dans des cellules eucaryotes.

Les canaux calciques comprennent des canaux de type bas-seuil s'activant par de faibles dépolarisations et des canaux de type haut-seuil s'activant par de fortes dépolarisations. Les canaux de type haut-seuil représentent un complexe hétéromultimérique $\alpha_1\alpha_2\delta\beta$ et γ , dans lequel la sous-unité α_1 membranaire, constituant le canal proprement dit, est associée à une sous-unité intracellulaire régulatrice β (ou Ca $\nu\beta$), par l'intermédiaire de son domaine d'interaction (domaine AID pour *alpha interaction domain*), présentant un motif conservé : QQ-E-L-G-WI--E (code à une lettre ; - représentant n'importe quel acide aminé ; Pragnell et al., Nature, 1994, 368, 67-70 ; figure 1) dans lequel les résidus Y392, W395 et I396 sont essentiels pour la liaison de la sous-unité β (De Waard et al., FEBS, 1996, 380, 272-276). La sous-unité régulatrice β se lie au domaine AID par l'intermédiaire de son domaine BID (*beta interaction domain* ; DeWaard et al., J. Biol. Chem., 1995, 270, 12056-12064) qui est inclus dans un domaine *GK-like* (Hanlon et al., FEBS, 1999, 445, 366-370).

Sept sous-unités α_1 ont été identifiées : α_{1A} (Ca $\nu\alpha_{2.1}$), α_{1B} (Ca $\nu\alpha_{2.2}$), α_{1E} (Ca $\nu\alpha_{2.3}$), formant respectivement les canaux neuronaux de type P/Q et N et les canaux de type R, régulés par les protéines G (canaux sensibles aux protéines G) et α_{1S} (Ca $\nu\alpha_{1.1}$), α_{1C} (Ca $\nu\alpha_{1.2}$), α_{1D} (Ca $\nu\alpha_{1.3}$) et α_{1F} (Ca $\nu\alpha_{1.4}$), formant les canaux de type L,

insensibles aux protéines G, incluant les canaux cardiovasculaires (α_{1c}) et squelettiques (α_{1s}), (Lory et al., m/s, 2001, 10, 979-988).

Dans le système nerveux central, les canaux calciques haut-seuil de type N et P/Q sont directement impliqués dans le déclenchement du fonctionnement de la synapse : leur ouverture sous l'effet d'un potentiel d'action induit une entrée de calcium dans la terminaison présynaptique. Ce signal déclenche la sécrétion de neuromédiateurs tels que le glutamate dans la fente synaptique et, ainsi la propagation de l'influx nerveux dans la dendrite post-synaptique. Les canaux N et P/Q sont régulés par des récepteurs liés aux protéines G trimériques (RCPG) tels que les récepteurs métabotropiques de classe III du glutamate (pour revue : El Far et Betz., précité) ou les récepteurs noradrénergiques, muscariniques, GABAergiques (GABA 5 γ -aminobutyric acid), sérotoninergiques, dopaminergiques, et aux opiacées (pour revue : Hille, Trends NeuroSci., 1994, 17, 531-536). Il a été montré que le sous-complexe $G\beta\gamma$ est directement responsable d'une inhibition de l'activité des canaux P/Q qui résulte d'une fixation directe de $G\beta\gamma$ sur la boucle intra-cytoplasmique reliant les domaines membranaires I et II (boucle I-II) de la sous-unité α_1 (De Waard et al., Nature, 1997, 385, 446-450). De fait, cette boucle présente plusieurs sites d'interaction avec $G\beta\gamma$, chevauchants le domaine de liaison à la sous-unité régulatrice $Ca_v\beta$ (domaine AID ; Figure 1), dont un motif consensus **QQ-R-L-GY** inclus dans le domaine AID, est essentiel pour la liaison de $G\beta\gamma$ (Figure 1 ; De Waard et al., Nature 1997, 385, 446-450 ; Zamponi et al., Nature, 1997, 385, 442-446). De plus, la sous-unité régulatrice $Ca_v\beta$ semble contrecarrer l'effet fonctionnel des protéines G (Bourinet et al., P.N.A.S., 1996, 93, 1486-1491). Ainsi, il semblerait que cet antagonisme implique une compétition physique entre la sous-unité $Ca_v\beta$ et la protéine $G\beta\gamma$ au niveau de la région AID de la boucle I-II (Dolphin et al., J. Physiol., 1998, 506, 3-11).

Les Inventeurs ont construit des protéines chimériques par fusion NH_2 et/ou $COOH$ terminale :

(i) de la boucle I-II de la sous-unité α_1 de canaux calciques haut-seuil sensibles ou insensibles aux protéines G (respectivement, α_{1A} ou $Ca_v\alpha_{2,1}$ constitutive d'un canal neuronal de type P/Q et α_{1c} ou $Ca_v\alpha_{1,2}$ constitutive d'un canal de type L

cardiovasculaire) ou un fragment de celle-ci ; ladite boucle correspond aux positions 367 à 487 en référence à la séquence de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$, et comprend le domaine de liaison à une sous-unité β d'un canal calcique (ou domaine AID) et les sites de liaison à une sous-unité $\text{G}\beta$ d'une protéine G (figure 1), et

- 5 (ii) d'une sous-unité β d'un canal calcique haut-seuil, capable de se lier audit fragment de la sous-unité α_1 .

Ils ont montré que l'ensemble des protéines chimériques obtenues -
comprenant la boucle I-II d'une sous-unité α_1 issue d'un canal calcique sensible ou
insensible aux protéines G ou un fragment de celle-ci incluant au moins le domaine
10 AID,- possède des propriétés surprenantes d'interaction intramoléculaire entre les
domaines de liaison des sous-unités α_1 et β du canal calcique qui empêchent la
fixation de la chimère sur le domaine AID d'une sous-unité α_1 . Ils ont confirmé que
ce masquage du domaine de liaison de la sous-unité β était bien dû à son interaction
intramoléculaire avec le domaine AID, car la délétion du domaine AID de la chimère
15 rétablit cette fixation. Ils ont également montré que la fixation de la chimère compre-
nant la boucle I-II d'une sous-unité α_{1A} "sensible aux protéines G", sur le domaine
d'interaction de la sous-unité α_1 est rétablie par addition de $\text{G}\beta\gamma$. Ce résultat a été
confirmé par la mise en évidence *ex vivo* de l'interaction d'une sous-unité β
recombinante marquée avec un fluorophore de type Cy3 avec une chimère
20 fluorescente de la sous-unité α_{1A} (GFP- α_{1A}), par mesure du transfert de fluorescence
(FRET) en microscopie confocale. Ces propriétés leur ont permis de démontrer que
de manière inattendue, la régulation des canaux P/Q passe par un déplacement, par le
complexe $\text{G}\beta\gamma$, de l'interaction entre la sous-unité régulatrice β et la sous-unité α du
canal calcique et non par son inhibition comme cela avait été suggéré précédemment.

25 De manière plus précise, les Inventeurs ont montré que la protéine
chimérique dérivée d'une sous-unité α_1 sensible aux protéines G existe sous deux
formes "fermée" ou "ouverte", respectivement en l'absence ou en présence de sous-
unité $\text{G}\beta$ capable de se lier audit fragment de la sous-unité α_1 , soit sous forme de
monomère $\text{G}\beta$, soit sous forme d'hétérodimère $\text{G}\beta\gamma$. En l'absence de $\text{G}\beta$ (ou $\text{G}\beta\gamma$), la
30 protéine chimérique est capable de se replier permettant ainsi aux domaines
d'interaction des sous-unités α_1 et β du canal calcique de s'associer par une liaison

intramoléculaire stable (forme fermée). En présence de $G\beta$ (ou $G\beta\gamma$), la liaison intramoléculaire est détruite et les domaines d'interaction des sous-unités α_1 et β du canal calcique se dissocient (forme ouverte), permettant ainsi à chacun des domaines d'interagir respectivement avec $G\beta$ (domaine d'interaction de la sous-unité α_1 : domaine AID) et/ou une sous-unité α_1 d'un canal calcique (domaine d'interaction de la sous-unité β : domaine BID).

De façon similaire, la protéine chimérique dérivée d'une sous-unité α_1 insensible aux protéines G est capable de se replier permettant ainsi aux domaines d'interaction des sous-unités α_1 et β du canal calcique de s'associer par une liaison intramoléculaire stable (forme fermée). En conséquence, en présence d'antagonistes de cette liaison, autres que $G\beta$ ou $G\beta\gamma$, la liaison intramoléculaire peut également être détruite et les domaines d'interaction des sous-unités α_1 et β du canal calcique se dissocier (forme ouverte), permettant ainsi à chacun des domaines d'interagir respectivement avec ledit antagoniste autre que $G\beta$ ou $G\beta\gamma$ (domaine d'interaction de la sous-unité α_1 : domaine AID) et/ou une sous-unité α_1 d'un canal calcique (domaine d'interaction de la sous-unité β : domaine BID).

En conséquence, du fait du remaniement de leur structure en présence de sous-unités $G\beta$ ou $G\beta\gamma$ libres ou bien d'autres antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 et β (passage de la forme fermée à la forme ouverte), les protéines chimériques dérivées des sous-unités α_1 et β de canaux calciques haut-seuil représentent des outils simples à mettre en oeuvre, sensibles, spécifiques et utiles pour les applications suivantes :

- les protéines chimériques dérivées d'une sous-unité α_1 sensible aux protéines G (par exemple : α_{1A} , α_{1B} et α_{1E}) permettent de déterminer les variations de la concentration cellulaire en sous-unités $G\beta\gamma$ libres, *ex vivo*, en temps réel et donc de mesurer l'activation des protéines G dans les cellules : de telles protéines chimériques représentent des biocapteurs ubiquitaires de l'activation des protéines G parfaitement adaptés à l'étude des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G et au criblage d'agonistes/antagonistes de ces voies de signalisation capables d'augmenter ou de diminuer la concentration en sous-unités

G β libres dans les cellules et donc de moduler l'activité de ces voies de régulation et de signalisation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G.

- les protéines chimériques dérivées d'une sous-unité α_1 sensible ou résistante aux protéines G (par exemple : α_{1A} , α_{1B} , α_{1E} , α_{1c} , α_{1d} , α_{1S} et α_{1f}) représentent des outils simples, sensibles et spécifiques, parfaitement adaptés au criblage d'antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 et β , capables de moduler l'activité de l'ensemble des canaux calciques haut-seuil.

- les protéines chimériques dérivées d'une sous-unité α_1 et d'une sous-unité β d'un canal calcique haut-seuil telles que définies ci-dessus sont également utiles pour le contrôle systématique pharmaco-toxicologique de nouveaux médicaments en phase I et la recherche d'agonistes naturels de récepteurs orphelins. En effet, le clonage du génome humain a permis d'identifier environ 350 récepteurs RCPG. Parmi ceux-ci, seulement 200 ont un ligand identifié. Les autres, appelés récepteurs orphelins, constituent potentiellement des cibles clefs pour l'identification de nouvelles voies de signalisation et de régulation cellulaire. La recherche d'agonistes et d'antagonistes de ces récepteurs revêt donc un intérêt majeur tant sur le plan de la recherche fondamentale que sur le plan thérapeutique.

En conséquence, la présente invention a pour objet une protéine chimérique dérivée d'un canal calcique haut seuil, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une sous-unité β ou un fragment de celle-ci incluant au moins le domaine BID, fusionné(e) à son extrémité NH₂ ou COOH avec la boucle I-II d'une sous-unité α_1 ou un fragment de celle-ci incluant au moins le domaine AID.

Conformément à l'invention les domaines AID et BID sont tels que définis ci-dessus ; la boucle I-II de la sous-unité α_1 comprend le domaine AID de liaison à la sous-unité β et les sites de liaison à la sous-unité G β d'une protéine G, dont un site consensus de liaison qui est inclus dans ce domaine AID. Ces différents domaines sont illustrés à la figure 1.

L'invention englobe les protéines chimériques issues des sous-unités α_1 et β de vertébrés, notamment de mammifères humains ou non-humains et de leurs orthologues chez les invertébrés.

Des protéines chimériques conformes à l'invention sont représentées

notamment par :

- une sous-unité β fusionnée à son extrémité NH_2 ou COOH avec la
boucle I-II d'une sous-unité α_1 , et

- 5 - le domaine *GK-like* d'une sous-unité β incluant le domaine BID
(Hanlon et al., précité), fusionné à son extrémité NH_2 ou COOH avec la boucle I-II
d'une sous-unité α_1 .

- Conformément à l'invention, la boucle I-II ou son fragment est, soit
fusionné directement à l'extrémité NH_2 ou COOH de la sous-unité β ou de son
10 fragment, soit les deux séquences sont séparées par un peptide espaceur dont la taille
et la séquence en acides aminés sont tels que les domaines AID et BID de la protéine
chimérique contenant ledit espaceur sont aptes à interagir pour former une liaison
intramoléculaire qui est déplacée en présence d'antagoniste (passage de la forme
fermée à la forme ouverte) ; un tel peptide espaceur est notamment représenté par une
15 séquence polyglycine.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite protéine
chimérique, elle est issue d'un canal calcique haut-seuil sensible aux protéines G.

- Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ladite
protéine chimérique comprend un fragment d'une sous-unité α_1 sélectionnée parmi
20 α_{1A} , α_{1B} et α_{1E} .

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite protéine
chimérique, ladite sous unité β est sélectionnée dans le groupe constitué par β_1 , β_2 , β_3
et β_4 .

- L'invention englobe également les protéines chimériques constituées
25 par des séquences fonctionnellement équivalentes aux séquences telles que définies ci-
dessus, c'est-à-dire dont la sous-unité β et la boucle I-II de la sous-unité α_1 ou leurs
fragments tels que définis ci-dessus sont capables de former une liaison
intramoléculaire par l'intermédiaire de leurs domaines d'interaction ; ladite liaison
étant éventuellement détruite en présence de sous-unités $G\beta$ ou $G\beta\gamma$ libres ou bien
30 d'autres antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 et β ("forme ouverte").

Parmi ces séquences, on peut citer par exemple les séquences dérivées des séquences précédentes par :

- mutation (substitution et/ou suppression, et/ou addition) d'un ou plusieurs acides aminés des séquences telles que définies ci-dessus,
- 5 - modification d'au moins une liaison peptidique $-CO-NH-$ de la chaîne peptidique de la protéine chimérique telle que définie ci-dessus, notamment par remplacement par une liaison différente de la liaison $-CO-NH-$ (méthylène amino, carba, cétométhylène, thioamide....) ou par introduction d'une liaison de type rétro ou rétro-inverso, et/ou,
- 10 - substitution d'au moins un acide aminé de la chaîne peptidique de la protéine chimérique telle que définie ci-dessus, par un résidu d'acide aminé non protéinogénique.

Par résidu d'acide aminé non protéinogénique, on entend tout acide aminé n'entrant pas dans la constitution d'une protéine ou d'un peptide naturel, notamment tout acide aminé dont le carbone portant la chaîne latérale R, à savoir le groupe $-CHR-$, situé entre $-CO-$ et $-NH-$ dans la chaîne peptidique naturelle, est remplacé par un motif n'entrant pas dans la constitution d'une protéine ou d'un peptide naturel.

La présente invention a notamment pour objet une protéine chimérique variant issue d'une protéine chimérique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle présente une mutation d'au moins un acide aminé dans les séquences de la dite sous-unité β et/ou de la boucle I-II d'une sous-unité α_1 .

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite protéine chimérique, ledit variant possède une mutation qui modifie l'affinité de la sous-unité β pour la boucle I-II de la sous-unité α_1 et/ou réciproquement ; de telles mutations permettent d'obtenir une protéine chimérique plus ou moins sensible à la concentration en sous-unité $G\beta$ ou $G\beta\gamma$ libres.

Parmi ces mutations on peut citer les mutations du domaine AID de la boucle I-II de la sous-unité α_1 , telles que décrites dans Pragnell et al., précité et De Waard et al. FEBS, 1996, 380, 272-276, à savoir : Q383A, Q384A, E386D, E386S, L389H, G391R, Y392S, Y392F, W395A, I396A et E400A.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite protéine chimérique ou de son variant, elle est couplée, de préférence de manière covalente, à au moins un marqueur approprié permettant la détection et/ou la purification et/ou l'immobilisation de ladite protéine, par exemple : un épitope antigénique, une étiquette du type polyhistidine; un composé luminescent (fluorophore telle que la GFP ou l'un de ses variants : CFP, YFP et BFP), radioactif, ou enzymatique.

Conformément à l'invention le dit couplage est réalisé par tout moyen approprié, notamment par une liaison peptidique par l'intermédiaire des fonctions COOH et/ou NH₂ terminales de la chaîne peptidique, ou bien par une autre liaison covalente, telle que par exemple : une liaison ester, éther, thioéther, thioester, par l'intermédiaire de fonctions réactives de la chaîne latérale d'un acide aminé de la chaîne peptidique.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, la dite protéine chimérique comprend un fluorophore accepteur ou donneur respectivement à son extrémité NH₂ et/ou COOH.

Les fluorophores accepteurs, par exemple CFP ou BFP, peuvent être couplés indifféremment à l'extrémité NH₂ ou COOH de la protéine chimérique, les fluorophores donneurs, par exemple GFP ou YFP sont fusionnés à l'extrémité opposée de ladite protéine chimérique. De telles protéines chimériques sont utiles pour l'étude *ex vivo* en temps réel de l'activation des protéines G et le criblage de molécules capables de moduler cette activation par mesure du transfert de fluorescence (FRET).

En effet, le marquage par un composé luminescent présente l'avantage d'obtenir un signal localisé qui ne nécessite pas la présence d'autres réactifs comme c'est le cas pour les marquages enzymatiques. Ce type de marquage permet également l'utilisation de phénomène tel que le transfert d'énergie qui peut s'effectuer selon différents mécanismes : transfert d'énergie par résonance, transfert d'énergie radiatif (l'accepteur absorbe la lumière émise par le donneur) et transfert d'électron.

Ce transfert d'énergie, entre un composé "donneur" (D) luminescent et un composé "accepteur" (A) luminescent ou non, et qui est dépendant de la distance entre A et D, a été utilisé pour la réalisation de nombreux dosages. On choisit D et A, qui sont couplés à chaque extrémité de la protéine chimérique afin que le transfert d'énergie n'ait lieu que lorsque l'interaction intramoléculaire entre les domaines BID et

AID a lieu (forme fermée). Ce phénomène se traduit par une diminution ou extinction de la luminescence de D et une émission de luminescence de A si celui-ci est luminescent, lorsque D est excité. Lors de ces dosages on mesure soit la variation de la luminescence de A, soit la variation de la luminescence de D ; la nature de A et de D étant variable. Par exemple, pour mesurer la variation de luminescence de A on peut utiliser comme donneur et accepteur deux protéines fluorescentes ou bien comme donneur un complexe de terres rares (europium, terbium) avec un chélate, un cryptate ou un macrocycle et comme accepteur une protéine fluorescente. La mesure de la variation de luminescence de D repose sur la capacité d'un composé (A) à diminuer ou supprimer la luminescence d'un autre composé (D) lorsque ceux-ci sont suffisamment proches ("Quench"). La gamme de molécules A pouvant être utilisées est donc plus étendue et inclut ainsi des composés non luminescents tels que des métaux lourds, des atomes lourds, des molécules chimiques comme par exemple le rouge de méthyle, des nanoparticules telles que celles vendues sous la dénomination Nanogold® par la société Nanoprobe (USA), ou bien encore les molécules vendues sous les dénominations DABCYL® (Eurogentec, Belgique), QSY Dyes (Molecular Probes Inc., USA), ElleQuencher® (Oswell/Eurogentec) ou Black Hole Quenchers® (Biosearch Technologies Inc., USA).

La présente invention a également pour objet un peptide, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment d'au moins 7 acides aminés de la séquence de la protéine chimérique telle que définie ci-dessus, situés à la jonction de la sous-unité β et de la boucle I-II de la sous-unité α_1 ou de leurs fragments tels que définis ci-dessus ; de tels peptides permettent notamment de produire des anticorps spécifiques de la protéine chimérique selon l'invention.

La présente invention a également pour objet des anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre une protéine chimérique ou un peptide tels que définis ci-dessus.

Conformément à l'invention, lesdits anticorps sont soit des anticorps monoclonaux, soit des anticorps polyclonaux.

Ces anticorps peuvent être obtenus par les méthodes classiques, connues en elles-mêmes, comprenant notamment l'immunisation d'un animal avec

une protéine ou un peptide conforme à l'invention, afin de lui faire produire des anticorps dirigés contre ladite protéine ou ledit peptide.

De tels anticorps sont utiles notamment pour immobiliser la protéine chimérique sur un support solide, la purifier ou bien la détecter.

5 La présente invention a également pour objet une molécule d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences codant pour une protéine chimérique ou un peptide tels que définis ci-dessus et les séquences complémentaires des précédentes, sens ou anti-sens.

L'invention a également pour objet des sondes et des amorces, 10 caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence d'environ 10 à 30 nucléotides correspondant à celle située à la jonction de la sous-unité β et de la boucle I-II de la sous-unité α_1 ou de leurs fragments tels que définis ci-dessus ; ces sondes et ces amorces permettent de détecter/amplifier spécifiquement lesdites molécules d'acide nucléique codant la protéine chimérique selon l'invention.

15 L'invention a également pour objet d'autres amorces permettant d'amplifier spécifiquement la sous-unité β et/ou la boucle I-II de la sous-unité α_1 ou leurs fragments tels que définis ci-dessus, caractérisées en ce qu'elles sont sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO : 1, 2, 4, 6, 7, 8 et 9.

20 Les molécules d'acide nucléique selon l'invention sont obtenues par des méthodes classiques, connues en elles-mêmes, en suivant les protocoles standards tels que ceux décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA).

Les séquences codant pour une protéine chimérique selon l'invention 25 peuvent être obtenues par amplification d'une séquence nucléique par PCR ou RT-PCR à l'aide d'une paire d'amorces appropriée ou bien par criblage de banques d'ADN chimérique par hybridation avec une sonde homologe.

Les molécules d'acides nucléiques dérivées, codant pour un variant 30 de la protéine chimérique selon l'invention, sont obtenues par les méthodes classiques, permettant d'introduire des mutations dans une séquence d'acide nucléique, connues en elles-mêmes, suivant les protocoles standards précités. Par exemple, la séquence codant pour un variant de la protéine chimérique selon l'invention peut-être obtenue

par mutagenèse dirigée selon la méthode de Kunkel et al., (P.N.A.S., 1985, 82, 488-492).

La présente invention a également pour objet un vecteur recombinant eucaryote ou procaryote, caractérisé en ce qu'il comprend un insert constitué par les

5 molécules d'acides nucléiques codant pour une protéine chimérique telle que définie ci-dessus.

De préférence, ledit vecteur recombinant est un vecteur d'expression dans lequel ladite molécule d'acide nucléique ou l'un de ses fragments sont placés sous le contrôle d'éléments régulateurs de la transcription et de la traduction appropriés. En

10 outre, ledit vecteur peut comprendre des séquences fusionnées en phase avec l'extrémité 5' et/ou 3' dudit insert, utiles pour l'immobilisation, et/ou la détection et/ou la purification de la protéine exprimée à partir dudit vecteur. De nombreux vecteurs dans

lesquels on peut insérer une molécule d'acide nucléique d'intérêt afin de l'introduire et de la maintenir dans une cellule hôte eucaryote ou procaryote, sont connus en eux-

15 mêmes ; le choix d'un vecteur approprié dépend de l'utilisation envisagée pour ce vecteur (par exemple répllication de la séquence d'intérêt, expression de cette séquence, maintien de la séquence sous forme extrachromosomique ou bien intégration dans le matériel chromosomique de l'hôte), ainsi que de la nature de la cellule hôte. Par exemple, on peut utiliser des vecteurs viraux ou non-viraux comme des

20 plasmides.

Ces vecteurs sont construits et introduits dans des cellules hôtes par les méthodes classiques d'ADN recombinant et de génie génétique, qui sont connues en elles-mêmes.

Selon un mode de réalisation dudit vecteur recombinant, il s'agit

25 d'un vecteur d'expression eucaryote présentant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 5 et SEQ ID NO: 10 ; le plasmide SEQ ID NO: 5 contient la boucle I-II de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$ de lapin fusionnée à l'extrémité C-terminale de sous-unité $\text{Ca}_v\beta_3$ de rat, sous le contrôle du promoteur CMV et le plasmide SEQ ID NO: 10 contient un insert constitué de 5' en 3' par la

30 fusion en phase des fragments suivants : la séquence GAP-43, l'ADNc codant pour l'EGFP (donneur de fluorescence), le domaine *GK-like* de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta_3$ de rat,

la boucle I-II de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$ de lapin et l'ADNc codant pour la CFP (accepteur de fluorescence).

La présente invention a également pour objet des cellules modifiées par une protéine chimérique, une molécule d'acide nucléique ou bien un vecteur recombinant tels que définis ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, lesdites cellules sont des cellules eucaryotes.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, lesdites cellules expriment au moins un récepteur capable de se lier aux protéines G (RCPG) ; lesdites cellules sont, soit des cellules exprimant constitutivement au moins un RCPG, soit des cellules modifiées qui expriment un RCPG recombinant.

Des cellules modifiées conformes à l'invention peuvent être obtenues par tous moyens, connus en eux-mêmes, permettant d'introduire une molécule d'acide nucléique ou une protéine dans une cellule-hôte. Par exemple, dans le cas de cellules animales, on peut utiliser entre autres des vecteurs viraux tels que les adénovirus, les rétrovirus, les lentivirus et les AAV, dans lesquels a été insérée préalablement la séquence d'intérêt ; on peut également associer ladite séquence nucléotidique (isolée ou insérée dans un vecteur plasmidique) ou peptidique avec une substance lui permettant de franchir la membrane des cellules-hôte, par exemple une préparation de liposomes, de lipides ou de polymères cationiques, ou bien l'injecter directement dans la cellule hôte.

La présente invention a pour objet des animaux et en particulier des mammifères transgéniques non-humains, caractérisés en ce que tout ou partie de leurs cellules sont transformées par une molécule d'acide nucléique selon l'invention. Il s'agit par exemple d'animaux dans lesquels on a introduit une séquence codant pour la protéine chimérique selon l'invention sous contrôle le contrôle d'éléments régulateurs de la transcription et de la traduction appropriés. De tels animaux transgéniques sont utiles, notamment pour les étapes de criblages secondaires : i) pour évaluer le ciblage cellulaire, voire tissulaire d'une molécule active sur les RCPG ou les canaux calciques, identifiée lors d'un criblage primaire, ii) pour étudier la biodisponibilité d'une telle molécule, et iii) pour la recherche, en première approche, d'effets secondaires éventuels d'une telle molécule.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques, les molécules d'acides nucléiques, les vecteurs recombinants, les cellules modifiées et les mammifères non-humains transgéniques tels que définis ci-dessus pour l'étude des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques, les molécules d'acides nucléiques, les vecteurs recombinants, les cellules modifiées et les mammifères non-humains transgéniques tels que définis ci-dessus pour le criblage d'agonistes et/ou d'antagonistes des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques, les molécules d'acides nucléiques, les vecteurs recombinants, les cellules modifiées et les mammifères non-humains transgéniques tels que définis ci-dessus pour le criblage d'antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 et β des canaux calciques haut-seuil ; de tels antagonistes sont utiles pour moduler l'activité de l'ensemble des canaux calciques haut-seuil et représentent donc des médicaments susceptibles d'être utilisés dans le traitement des maladies liées à un dysfonctionnement de l'homéostasie calcique et des pathologies où la modulation de l'entrée calcique peut compenser un déficit cellulaire, notamment les épilepsies, les ataxies, les migraines, les hypo- et hyper-calcémies musculaires, le diabète, et les maladies cardiovasculaires.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, l'étude des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G est réalisée par une méthode comprenant au moins les étapes suivantes :

a) la culture de cellules modifiées exprimant une protéine chimérique issue d'un canal calcique sensible aux protéines G et un récepteur couplé au protéine G, telles que définies ci-dessus,

b) la transduction d'un signal par l'intermédiaire dudit récepteur couplé aux protéine G, par tout moyen approprié, et

c₁) la détermination, par tout moyen approprié, de la proportion de ladite protéine chimérique exprimée dans lesdites cellules qui est liée à une sous-unité G $\beta\gamma$.

Une telle détermination permet d'évaluer les variations de la concentration cellulaire en sous-unités G $\beta\gamma$ libres et donc de mesurer l'activation des protéines G dans les cellules.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le criblage d'agonistes/d'antagonistes des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G est réalisée par une méthode comprenant au moins les étapes suivantes :

a₂) la culture de cellules modifiées exprimant une protéine chimérique issue d'un canal calcique sensible aux protéines G et un récepteur couplé au protéine G telles que définies ci-dessus,

b₂) la transduction d'un signal par l'intermédiaire dudit récepteur couplé aux protéine G, par tout moyen approprié,

c₂) la détermination comparative, par tout moyen approprié, de la proportion de ladite protéine chimérique exprimée dans les cellules qui est liée à une sous-unité G $\beta\gamma$, avant et après la mise en contact desdites cellules en b₂) avec une molécule à tester, et

d₂) l'identification des molécules agonistes/antagonistes des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G, correspondant à celles capables respectivement d'augmenter et de diminuer la concentration cellulaire en sous-unités G $\beta\gamma$ libres.

De manière avantageuse, lesdites cellules modifiées en a₁) ou en a₂) expriment une protéine chimérique telle que définie ci-dessus couplée à ses extrémités NH₂ et COOH, respectivement à un fluorophore donneur et un fluorophore accepteur de fluorescence et ladite détermination en c₁) ou en c₂) est effectuée par la technique de transfert de fluorescence (FRET).

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le criblage d'antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 et β des canaux calciques haut-seuil est réalisé par une méthode comprenant au moins les étapes suivantes :

a₃) la mise en contact d'une molécule à tester avec une protéine chimérique issue d'un canal calcique sensible ou insensible aux protéines G telle que définie ci-dessus et avec un peptide comprenant le domaine AID d'une sous-unité α_1 insensible aux protéines G;

5 b₃) la mesure, par tout moyen approprié, de la liaison de ladite protéine chimérique audit peptide, et

c₃) l'identification des antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 et β correspondant à ceux avec lesquels on observe une liaison de ladite protéine chimérique audit peptide.

10 Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, ledit peptide comprenant le domaine AID est immobilisé sur un support solide, et ladite protéine chimérique est couplée à un marqueur permettant la mesure de ladite liaison en b₃), tel que défini ci-dessus, notamment un fluorophore.

L'invention a également pour objet une trousse pour la mise en œuvre des méthodes telles que définies ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle inclut au moins l'un des produits suivants : une protéine chimérique, un anticorps, un vecteur recombinant, une cellule modifiée ou un mammifère non-humain transgénique, tels que définis ci-dessus.

La protéine chimérique selon l'invention présente les avantages
20 suivants :

- elle constitue un biocapteur ubiquitaire des sous-unités $G\beta\gamma$ libres endogènes, adapté à l'étude en temps réel des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés au protéine G, et au criblage systématique (criblage à haut-débit) de molécules capables de les moduler, potentiellement utilisables comme médicament pour le traitement des maladies dans lesquelles on observe un dysfonctionnement de ces voies, notamment des pathologies du système immunitaire (pour revue voir Lombardi et al, Crit. Rev. Immunology, 2002, 22, 141-163 ; Onuffer et Horuk, Trends in Pharmacol, 2002, 23, 459-467) et des pathologies neuropsychiatriques et cardiovasculaires (Seifert et Wenzel-Seifert, Naumyn-Schmeideberg's Arch. Pharmacol. , 2002, 366, 381-416). En outre son utilisation est simple dans la mesure elle est permet de s'affranchir partiellement des problèmes de stoechiométrie puisque son utilisation ne fait intervenir que deux molécules

($\text{Ca}_v\beta/\text{Ca}_v\alpha\text{-G}\beta\gamma$) au lieu de trois partenaires ($\text{Ca}_v\alpha/\text{Ca}_v\beta/\text{G}\beta\gamma$) pour les méthodes de l'art antérieur.

- elle est adaptée au criblage systématique (criblage à haut-débit) de molécules capables de moduler l'activité des canaux calciques à haut-seuil, potentiellement utilisables comme médicament pour le traitement des maladies dans lesquelles on observe un dysfonctionnement de l'homéostasie calcique et des pathologies où la modulation de l'entrée calcique peut compenser un déficit cellulaire telles que définies ci-dessus.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de la protéine chimérique objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre le chevauchement, dans la boucle I-II de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$, des domaines de liaison à la sous-unité β (domaine AID) et au complexe $\text{G}\beta\gamma$. Le domaine AID est représenté par une boîte noire (positions 383 à 400). Les sites de liaison pour la sous-unité $\text{G}\beta$ ($\text{G}\beta\gamma$) sont représentés par des boîtes hachurées ; le site en position centrale (QQ-R-L-GY) qui est essentiel pour la liaison de la sous-unité $\text{G}\beta$ ($\text{G}\beta\gamma$) est inclus dans le domaine AID.

- les figures 2 et 3 illustrent le déplacement de l'interaction $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}\text{-Ca}_v\beta$ par le complexe $\text{G}\beta\gamma$ des protéines G :

- la figure 2a illustre la liaison de la sous-unité β_3 (1 à 3 pM) avec le domaine $\text{AID}_{1.2}$ de la protéine de fusion $\text{GST-AID}_{1.2}$ (1 μM),

- la figure 2b montre que la fusion de la sous-unité β_3 avec la boucle I-II de la sous-unité $\alpha_{2.1}$ (Chimère $\text{Ca}_v\beta_3\text{-I-II}_{2.1}$) empêche sa liaison avec le domaine $\text{AID}_{1.2}$ de la protéine de fusion $\text{GST-AID}_{1.2}$,

- la figure 2c montre que la délétion des 18 acides aminés du domaine $\text{AID}_{2.1}$ (Chimère $\text{Ca}_v\beta_3\text{-I-II}_{2.1}\Delta\text{AID}$) restaure la liaison de la sous-unité β_3 avec le domaine $\text{AID}_{1.2}$ de la protéine de fusion $\text{GST-AID}_{1.2}$,

- la figure 3 montre que l'addition de complexe $\text{G}\beta\gamma$ déplace l'interaction intramoléculaire entre la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ et la boucle I-II de la sous-unité $\alpha_{2.1}$ de la chimère $\text{Ca}_v\beta_3\text{-I-II}_{2.1}$, permettant ainsi à la sous-unité β_3 de se lier avec le

domaine AID_{1,2} de la protéine de fusion GST-AID_{1,2} ; la concentration de Gβγ, capable de déplacer 50 % de la liaison entre la sous-unité Ca_vβ et domaine AID_{2,1} (IC₅₀) est de 160nM,

- les figures 4 à 7 illustrent l'analyse en FRET, du désassemblage

5 du canal calcique P/Q induit par le complexe Gβγ :

- la figure 4a illustre le marquage au Cy3 de la sous-unité His-Ca_vβ₃ purifiée. CB : coloration au bleu de Coomassie d'un gel SDS-PAGE illustrant la pureté de la protéine. FS = enregistrement de la fluorescence d'un gel non coloré montrant le marquage covalent de la protéine,

10 - la figure 4b illustre l'effet de la sous-unité Ca_vβ₃ couplée à un fluorochrome (Cy3-Ca_vβ₃) sur la relation courant-voltage de canaux Ca_vα_{2,1} exprimés dans des ovocytes de xénopes, par comparaison avec la sous-unité Ca_vβ₃ non marquée (injection d'ARNc),

- la figure 5a illustre l'observation en microscopie confocale de deux
15 régions distinctes, d'ovocytes de xénopes contenant Ca_vα_{2,1} et Cy3-Ca_vβ₃. T = transmission, F = fluorescence,

- la figure 5b illustre le spectre d'émission de la fluorescence de GFP-Ca_vα_{2,1}, Cy3-Ca_vβ₃ et (GFP-Ca_vα_{2,1} + Cy3-Ca_vβ₃),

- la figure 6 illustre la cinétique de diminution du transfert de
20 fluorescence induit par l'injection de 100 nM de Gβγ. Panneau du haut : variations du spectre d'émission de la fluorescence et panneau du bas : variations du rapport des intensités de fluorescence (R_f) à 585 nm et 525 nm,

- la figure 7 illustre les valeurs R_f des ovocytes non-injectées (-), injectées avec Gβγ (100 nM) ou avec du Gβγ inactivé par la chaleur (HI- Gβγ).

25 - la figure 8 (a à c) illustre la séquence du plasmide pcDNA3Cavβ3-I-H_{2,1} (SEQ ID NO: 5) contenant la boucle I-II de la sous-unité Ca_vα_{2,1} de lapin fusionnée à l'extrémité C-terminale de sous-unité Ca_vβ₃ de rat, sous le contrôle du promoteur CMV.

- la figure 9 (a à c) illustre la séquence du plasmide pCHIC (SEQ ID
30 NO: 10) dérivé du vecteur pEYFPmemb.(CLONTECH), contenant un insert constitué de 5' en 3' par la fusion en phase des fragments suivants : la séquence GAP-43,

l'ADNc codant pour l'EGFP (donneur de fluorescence), le domaine *GK-like* de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta_3$ de rat, la boucle I-II de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$ de lapin et l'ADNc codant pour la CFP (accepteur de fluorescence).

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1: CONSTRUCTION D'UNE PROTEINE CHIMERIQUE RECOMBINANTE $\text{Ca}_v\beta_3$ -I-II_{2.1}

1). Matériels et méthodes

10 L'amplification PCR et le clonage de l'ADN recombinant sont réalisés par les techniques classiques connues en elles-mêmes de l'Homme du métier, en suivant les protocoles standards tels que ceux décrits par exemple dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA).

15 Un plasmide d'expression contenant un ADNc codant une protéine chimérique selon l'invention, constituée par la fusion C-terminale de la sous-unité β_3 de rat avec la boucle intracellulaire I-II de la sous-unité α_1 de lapin et a été construit de la façon suivante:

L'ADNc de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta_3$ de rat (correspondant aux positions 20 98 à 1545 de la séquence GENBANK M88755) est amplifiée par PCR à l'aide des amorces sens et anti-sens suivantes:

- 5'-TTTGGTACCATGGATGACGACTCCTACGTGCCCCGGGTTTGAGGACTCGGAGGCGGGTT-3' (SEQ ID NO: 1), et

- 5'-GCGGAATTCGTAGCTGTCCTTAGGCCAAGGCCGGTTACGCTGCCAGTT-3', (SEQ ID NO: 2).

Le fragment ainsi obtenu a été cloné entre les sites *Kpn I* et *EcoR I* du plasmide d'expression (pcDNA3, IN VITROGEN) pour donner le plasmide recombinant pcDNA3-Ca β 3.

5 Le fragment d'ADNc correspondant à la boucle I-II de la sous-unité Ca α _{2.1} de lapin (positions 1383 à 1754 de la séquence GENBANK X57477), dont la séquence est illustrée par la figure 1, a été amplifié par PCR à l'aide des amorces sens et anti-sens suivantes :

- 5'-GGGGAATTCGCCAAGAAAGGGAGCGGGTGGAGAAC-3' (SEQ ID NO: 3 ; De Waard et al.,
10 précité et Bichet et al., Neuron, 2001, 25, 177-190), et

- 5'-TTTGAATTCTTACTGAGTTTGGACCATGCGACGGATGTAGAAACGCATTCT-3' (SEQ ID NO: 4).

Le fragment obtenu a été cloné au site *EcoR I* du plasmide pcDNA3-Ca β 3 pour donner le plasmide recombinant pcDNA3-Ca β 3-I-II_{2.1}.

Un plasmide contrôle contenant un ADNc codant une protéine
15 chimérique constituée par la fusion C-terminale de la sous-unité β 3 de rat avec la boucle intracellulaire I-II de la sous-unité Ca α _{2.1} de lapin déletée du domaine AID a été construit de façon similaire ; le plasmide recombinant ainsi obtenu est dénommé pcDNA3-Ca β 3-I-II_{2.1} Δ AID.

2) Résultats

20 Le plasmide recombinant pcDNA3-Ca β 3-I-II_{2.1} présente la séquence SEQ ID NO: 5. La séquence peptidique déduite de la séquence nucléotique obtenue par séquençage automatique de l'insert cloné dans le plasmide pcDNA3-Ca β 3-I-II_{2.1} présente la séquence attendue pour une protéine chimérique selon l'invention. De même la séquence peptidique déduite de la séquence nucléotique
25 obtenue par séquençage automatique de l'insert cloné dans le plasmide pcDNA3-Ca β 3-I-II_{2.1} Δ AID correspond à celle attendue pour une protéine chimérique déletée du domaine AID.

EXEMPLE 2 : MISE EN EVIDENCE IN VITRO DU DEPLACEMENT DE L'INTERACTION $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}\text{-Ca}_v\beta$ PAR LE COMPLEXE $\text{G}\beta\gamma$ DES PROTEINES

G.

1) Matériels et méthodes

5 L'expression de l'ADN recombinant et l'analyse des protéines recombinantes sont réalisés par les techniques classiques connues en elles-mêmes de l'Homme du métier, en suivant le protocoles standards tels que ceux décrits par exemple dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA) et dans *Current*
10 *protocols in Immunology* (John E. Coligan, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA).

a) Expression des protéines chimériques recombinantes et de la fusion GST-AID_{1,2}

Les protéines chimériques $\text{Ca}_v\beta_3\text{-I-II}_{2.1}$ et $\text{Ca}_v\beta_3\text{-I-II}_{2.1}\Delta\text{AID}$ et la sous-unité $\text{Ca}_v\beta_3$ sont transcrites et traduites *in vitro* en présence de [³⁵S]-méthionine à
15 partir des plasmides tels que décrits à l'exemple 1, à l'aide du kit TNT system PROMEGA, en suivant les instructions du fabricant.

La protéine de fusion GST-AID_{1,2} décrite dans Pagnell et al., précité. est produite et purifiée comme décrit par les auteurs précédents. La protéine GST produite et purifiée dans les mêmes conditions est utilisée comme contrôle.

20 b) Analyse *in vitro* de la de la régulation de l'interaction $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}\text{-Ca}_v\beta$ par le complexe $\text{G}\beta\gamma$ des protéines G.

L'analyse *in vitro* de la régulation de l'interaction $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}\text{-Ca}_v\beta$ par le complexe $\text{G}\beta\gamma$ des protéines G est réalisée en suivant les protocoles tels que décrits dans De Waard et al., Nature, 1997, 385, 446-450. De manière plus précise, la sous-
25 unité β_3 et les protéines chimériques marquées ([³⁵S] $\text{Ca}_v\beta_3$, [³⁵S] $\text{Ca}_v\beta_3\text{-I-II}_{2.1}$ et [³⁵S] $\text{Ca}_v\beta_3\text{-I-II}_{2.1}\Delta\text{AID}$) sont incubées en l'absence ou en présence de la protéine de fusion GST-AID_{1,2} ou de la protéine GST, et éventuellement en présence de quantités croissantes de $\text{G}\beta\gamma$ (10 à 900 nM, CALBIOCHEM).

Le produit d'incubation est séparé par électrophorèse en gel de
30 polyacrylamide (SDS-PAGE) et le gel est autoradiographié.

2) Résultats

Les résultats illustrés dans les figures 2 et 3 sont les suivants:

- la figure 2a montre que la sous-unité β_3 (1 à 3 pM) se lie avec le domaine AID_{1,2} de la protéine de fusion GST-AID_{1,2} (1 μ M),
- la figure 2b montre que la fusion de la sous-unité β_3 avec la boucle I-II de la sous-unité $\alpha_{2,1}$ (Chimère Ca_v β_3 - I-II_{2,1}) empêche sa liaison avec le domaine AID_{1,2} de la protéine de fusion GST-AID_{1,2},
- la figure 2c montre que la délétion des 18 acides aminés du domaine AID_{2,1} (Chimère Ca_v β_3 - I-II_{2,1} Δ AID) restaure la liaison de la sous-unité β_3 avec le domaine AID_{1,2} de la protéine de fusion GST-AID_{1,2},
- la figure 3 montre que l'addition de complexe G $\beta\gamma$ déplace l'interaction intramoléculaire entre la sous-unité Ca_v β et la boucle I-II de la sous-unité $\alpha_{2,1}$ de la chimère Ca_v β_3 - I-II_{2,1}, permettant ainsi à la sous-unité β_3 de se lier avec le domaine AID_{1,2} de la protéine de fusion GST-AID_{1,2} ; la concentration IC₅₀ de G $\beta\gamma$, capable de déplacer 50 % de la liaison entre la sous-unité Ca_v β et domaine AID_{2,1}, après 30 min d'incubation à 30°C, est de 160nM; cette valeur est 2 à 3 fois plus élevée que celle relatives à l'affinité de G $\beta\gamma$ pour la boucle I-II_{2,1}, précédemment rapportées (De Waard et al., Nature , 1997, 385, 446-450).

EXEMPLE 3 : MISE EN EVIDENCE *EX VIVO* DU DEPLACEMENT DE L'INTERACTION Ca_v $\alpha_{2,1}$ -Ca_v β PAR LE COMPLEXE G $\beta\gamma$ DES PROTEINES

G.

1) Matériels et méthodes

a) Marquage au Cy3 de la protéine recombinante His-Ca_v β_3 purifiée.

La protéine recombinante His-Ca_v β_3 purifiée (Geib et al., Biochem J., 2002, 364, 285-292 ; Fathallah et al., Eur. J. Neurosci., 2002, 16, 219-228) est couplée au maleimide de Cy3 monoréactif en suivant les instructions du fabricant (Amersham Pharmacia Biotech).

b) Injection des ovocytes de xénope et enregistrements électrophysiologiques.

La préparation, l'injection des ovocytes de xénopes et les enregistre

ments électrophysiologiques sont réalisés comme décrit dans Geib et al., précité. Les effets des complexes $G\beta\gamma$ sur la relation courant-voltage et l'inactivation de l'état d'équilibre sont analysés 30 min après l'injection.

c) Mesure du transfert de fluorescence (FRET).

5 Les ovocytes sont analysés en microscopie confocale (microscope TCS-SP2, LEICA, en mode « XYλ »), 4 à 7 jours après l'injection.

L'émission de fluorescence est enregistrée à l'aide d'un laser à argon avec une excitation à 488 nm et un miroir dichroïque (488/543/633). La fluorescence est mesurée au travers de 14 filtres (10 nm d'épaisseur) pour reconstruire le spectre d'émission. Pour chaque mesure, deux régions différentes sont analysées afin d'assurer la reproductibilité de la mesure. Les niveaux de FRET sont estimés par le rapport (585/525) entre la fluorescence à 585 nm (pic d'émission de l'accepteur Cy3) et la fluorescence à 525 nm (pic d'émission du donneur GFP).

2) **Résultats**

15 - La sous-unité $Ca_v\beta_3$ couplée au Cy3 (figure 4a) est aussi active que la sous-unité $Ca_v\beta_3$ sur la régulation des canaux $Ca_v\alpha_{2.1}$ exprimés dans des ovocytes de xénope (Figure 4b).

- L'injection de la protéine Cy3- $Ca_v\beta_3$ ou GFP- $Ca_v\alpha_{2.1}$ ou bien de l'ADNc codant pour ladite protéine, seul(e) ou en combinaison, résulte dans l'émission d'un signal de fluorescence élevé au niveau de la membrane plasmique (Figure 5a).

L'analyse de l'émission de fluorescence entre 500 et 640 nm, après excitation à 488 nm (figure 5b) montre que GFP- $Ca_v\alpha_{2.1}$ produit un signal élevé avec un maximum à 525 nm alors que Cy3- $Ca_v\beta_3$ seul est peu excité et produit un signal faible avec un maximum à 585 nm. Lorsque les deux protéines sont dans les ovocytes, le signal émis à 525 nm diminue de façon drastique alors que celui à 585 nm augmente significativement. Ces changements sont facilement quantifiables par la détermination du rapport des signaux de fluorescence à 585 nm et 525 nm ($R_f = 0,34 \pm 0,03$ pour GFP- $Ca_v\alpha_{2.1}$ (n=3), $R_f = 1,9 \pm 0,10$ pour Cy3- $Ca_v\beta_3$ (n=3) et $R_f = 3,9 \pm 0,22$ pour GFP- $Ca_v\alpha_{2.1}$ + Cy3- $Ca_v\beta_3$ (n=7). D'aussi grands changements résultant d'un transfert important de fluorescence, démontrent la proximité des fluorochromes GFP-

Cav $\alpha_{2,1}$ et Cy3-Cav β_3 .

- L'injection de G $\beta\gamma$ dans les ovocytes contenant à la fois GFP-Cav $\alpha_{2,1}$ et Cy3-Cav β_3 induit une disparition rapide du transfert de fluorescence (figure 6). Par comparaison, l'injection de G $\beta\gamma$ est sans effet dans les cellules contenant

5 uniquement GFP-Cav $\alpha_{2,1}$ ou Cy3-Cav β_3 .

Le rapport final des signaux de fluorescence ($0,82 \pm 0,06$, $n=7$) est de l'ordre de celui observé dans les ovocytes contenant uniquement GFP-Cav $\alpha_{2,1}$ ou Cy3-Cav β_3 indiquant que la dissociation du canal de Cy3-Cav β_3 est importante (figure 7). Par comparaison, l'injection de G $\beta\gamma$ inactivé par la chaleur est sans effet

10 ($R_f = 3,74 \pm 0,4$, $n=3$).

Ces résultats démontrent que G $\beta\gamma$ est aussi capable de déplacer *ex vivo* la sous-unité Cav β_3 de son site de liaison au canal Cav $\alpha_{2,1}$.

EXEMPLE 4 : CONSTRUCTION D'UN BIOCAPTEUR POUR MESURER L'ACTIVITE DES PROTEINES G PAR LA TECHNIQUE DE FRET

15 Une protéine chimérique contenant un fluorophore donneur de fluorescence (EGFP) à son extrémité NH₂ et un fluorophore accepteur de fluorescence (CFP) à son extrémité COOH est construite à partir du vecteur pEYFPmemb (CLONTECH). Ce vecteur présente l'avantage de posséder :

- une séquence GAP-43 qui permet un ancrage de la chimère à la membrane plasmique *via* son extrémité NH₂. L'ancrage à la membrane présente l'intérêt d'une part de maintenir la protéine à la membrane et d'autre part d'augmenter la probabilité de rencontre entre la protéine chimère et son ligand G $\beta\gamma$ qui est lui-même ancré à la membrane par une liaison de type palmitoylation, et

- une séquence EYFP en aval de GAP-43.

25 La construction est réalisée en deux étapes :

1^{ère} étape de clonage :

Le fragment d'ADN codant pour le domaine *GK-like* de la sous-unité β (Hanlon *et al.*, FEBS, 1999, 445, 366-370) fusionné à la boucle I-II de la sous-unité α_1 est amplifié par PCR à partir du plasmide pcDNA3-Cav β_3 -I-II_{2,1} (exemple 1) puis il est cloné en 3' du gène EYFP.

De manière plus précise, l'amplification PCR est réalisée à l'aide des amorces sens et anti-sens suivantes :

BsiWI PvuI

- 5'- AGCCGTACGCGATCGCATCTCTAGCCAAGCAGAAGCAAA -3' (SEQ ID NO: 6)

5

HpaI

SpeI

5'- CCCGTTAACCCCACTAGTCTGAGTTTTGACCATGCGACGGAT-3' (SEQ ID NO: 7)

Le produit PCR obtenu est cloné entre les sites *BsiWI* et *HpaI* du plasmide pEYFPmemb pour donner le plasmide pEYFmemChimBéta3I-II.

- 2^{ème} étape de clonage :

10

L' ADNc codant pour l'ECP est amplifié par PCR puis cloné dans le lasmide précédent, en 3' de l'insert β 3-I-II.

De manière plus précise, l'ECP est amplifiée par PCR à partir du vecteur pECP (Clontech), à l'aide des amorces sens et anti-sens suivantes :

SpeI

15 - 5'- GGGACTAGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG- 3' (SEQ ID NO: 8)

HpaI

- 5'- CCCGTTAAGTCCGAGAGTGATCCCGGCGGCGGT-3' (SEQ ID NO: 9)

Le produit PCR obtenu est cloné entre les sites *SpeI* et *HpaI* du plasmide pEYFmemChimBéta3I-II pour donner la plasmide pCHIC correspondant à

20 la séquence SEQ ID NO: 10.

REVENDICATIONS

1°) Protéine chimérique dérivée d'un canal calcique haut seuil, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une sous-unité β ou un fragment de celle-ci incluant au moins le domaine BID, fusionné(e) à son extrémité NH_2 ou COOH

5 avec la boucle I-II d'une sous-unité α_1 ou un fragment de celle-ci incluant au moins le domaine AID.

2°) Protéine chimérique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une sous-unité β fusionnée à son extrémité NH_2 ou COOH avec la boucle I-II d'une sous-unité α_1 .

10 3°) Protéine chimérique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est constituée par le domaine *GK-like* d'une sous-unité β fusionné à son extrémité NH_2 ou COOH avec la boucle I-II d'une sous-unité α_1 .

4°) Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la sous-unité β ou son fragment et la boucle I-II ou son
15 fragment sont séparés par un peptide espaceur.

5°) Protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle est issue d'un canal calcique haut-seuil sensible aux protéines G.

6°) Protéine chimérique selon la revendication 5, caractérisée en ce
20 qu'elle comprend la boucle I-II d'une sous-unité α_1 sélectionnée parmi α_{1A} , α_{1B} et α_{1E} ou un fragment de celle-ci.

7°) Protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle comprend une sous-unité β sélectionnée dans le groupe constitué par β_1 , β_2 , β_3 et β_4 ou un fragment de celle-ci.

25 8°) Protéine chimérique variant issue d'une protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle présente une mutation d'au moins un acide aminé dans les séquences de la dite sous-unité β et/ou de la boucle I-II d'une sous unité α_1 .

9°) Protéine chimérique variant selon la revendication 8, caractérisée
30 en ce que ladite mutation modifie l'affinité de la sous-unité β pour le fragment de la boucle I-II de la sous-unité α et/ou réciproquement.

10°) Protéine chimérique variant selon la revendication 8 ou la revendication 9, caractérisée en ce que lesdites mutations sont sélectionnées parmi les mutations suivantes du domaine AID de la boucle I-II de la sous-unité α_1 : Q383A, Q384A, E386D, E386S, L389H, G391R, Y392S, Y392F, W395A, I396A et E400A.

5 11°) Protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle est couplée, de préférence de manière covalente, à au moins un marqueur approprié permettant la détection et/ou la purification et/ou l'immobilisation de ladite protéine.

10 12°) Protéine chimérique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle comprend un fluorophore accepteur ou donneur respectivement à son extrémité NH_2 et/ou COOH .

13°) Protéine chimérique selon la revendication 12, caractérisée en ce que le fluorophore accepteur est la protéine fluorescente CFP ou BFP et le fluorophore donneur est la protéine fluorescente GFP ou YFP.

15 14°) Peptide, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment d'au moins 7 acides aminés de la séquence de la protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 situés à la jonction de la sous-unité β et de la boucle I-II de la sous-unité α_1 d'un canal calcique ou de leurs fragments tels que définis à la revendication 1.

20 15°) Anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 ou un peptide selon la revendication 14.

25 16°) Molécule d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences codant pour une protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 ou un peptide selon la revendication 15, et les séquences complémentaires des précédentes, sens ou anti-sens.

30 17°) Sondes et amorces, caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence d'environ 10 à 30 nucléotides correspondant à celle située à la jonction de la sous-unité β et de la boucle I-II de la sous-unité α_1 d'un canal calcique ou de leurs fragments tels que définis à la revendication 1.

18°) Amorces aptes à amplifier la sous-unité β et/ou la boucle I-II de la sous-unité α_1 d'un canal calcique ou leurs fragments tels que définis à la

10°) Protéine chimérique variant selon la revendication 8 ou la revendication 9, caractérisée en ce que lesdites mutations sont sélectionnées parmi les mutations suivantes du domaine AID de la boucle I-II de la sous-unité α_1 : Q383A, Q384A, E386D, E386S, L389H, G391R, Y392S, Y392F, W395A, I396A et E400A.

5 11°) Protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle est couplée, de préférence de manière covalente, à au moins un marqueur approprié permettant la détection et/ou la purification et/ou l'immobilisation de ladite protéine.

12°) Protéine chimérique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle comprend un fluorophore accepteur ou donneur respectivement à son
10 extrémité NH_2 et/ou COOH .

13°) Protéine chimérique selon la revendication 12, caractérisée en ce que le fluorophore accepteur est la protéine fluorescente CFP ou BFP et le fluorophore donneur est la protéine fluorescente GFP ou YFP.

14°) Peptide, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment d'au
15 moins 7 acides aminés de la séquence de la protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 situés à la jonction de la sous-unité β et de la boucle I-II de la sous-unité α_1 d'un canal calcique ou de leurs fragments tels que définis à la revendication 1.

15°) Anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre une
20 protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 ou un peptide selon la revendication 14.

16°) Molécule d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences codant pour une protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 ou un peptide selon la
25 revendication 14, et les séquences complémentaires des précédentes, sens ou anti-sens.

17°) Sondes et amorces, caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence d'environ 10 à 30 nucléotides correspondant à celle située à la jonction de la sous-unité β et de la boucle I-II de la sous-unité α_1 d'un canal calcique ou de leurs fragments tels que définis à la revendication 1.

30 18°) Amorces aptes à amplifier la sous-unité β et/ou la boucle I-II de la sous-unité α_1 d'un canal calcique ou leurs fragments tels que définis à la revendication 1.

revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 7, 8 et 9.

19°) Vecteur recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend un insert sélectionné dans le groupe constitué par les molécules d'acides nucléiques selon la revendication 16.

20°) Vecteur recombinant selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur d'expression eucaryote présentant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 5 et SEQ ID NO: 10.

21°) Cellules modifiées par un vecteur recombinant selon la revendication 20 ou 21 ou bien une protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.

22°) Cellules modifiées selon la revendication 21, caractérisées en ce qu'il s'agit de cellules eucaryotes.

23°) Cellules modifiées selon la revendication 21 ou la revendication 22, caractérisées en ce qu'elles expriment au moins un récepteur capable de se lier aux protéines G.

24°) Mammifère transgénique non-humain, caractérisé en ce que tout ou partie de ses cellules sont transformées par une molécule d'acide nucléique selon la revendication 16.

25°) Utilisation d'un produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, les molécules d'acides nucléiques selon la revendication 16 ou vecteurs recombinants selon la revendication 19 ou la revendication 20, les cellules modifiées selon l'une quelconque des revendications 21 à 23 et les mammifères transgéniques non-humains selon la revendication 24, pour l'étude des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G.

26°) Utilisation d'un produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, les molécules d'acides nucléiques selon la revendication 16, les vecteurs recombinants selon la revendication 19 ou la revendication 20, les cellules modifiées selon l'une quelconque des revendications 21 à 23 et les mammifères transgéniques non-humains selon la

cation 1, caractérisées en ce qu'elles sont sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 7, 8 et 9.

19°) Vecteur recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend un insert sélectionné dans le groupe constitué par les molécules d'acides nucléiques selon la
5 revendication 16.

20°) Vecteur recombinant selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur d'expression eucaryote présentant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 5 et SEQ ID NO: 10.

21°) Cellules modifiées par un vecteur recombinant selon la revendication 19 ou 20, par une molécule d'acide nucléique selon la revendication 16 ou par
10 une protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

22°) Cellules modifiées selon la revendication 21, caractérisées en ce qu'il s'agit de cellules eucaryotes.

23°) Cellules modifiées selon la revendication 21 ou la revendication
15 22, caractérisées en ce qu'elles expriment au moins un récepteur capable de se lier aux protéines G.

24°) Mammifère transgénique non-humain, caractérisé en ce que tout ou partie de ses cellules sont transformées par une molécule d'acide nucléique selon la revendication 16.

20 25°) Utilisation d'un produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, les molécules d'acides nucléiques selon la revendication 16, les vecteurs recombinants selon la revendication 19 ou la revendication 20, les cellules modifiées selon l'une quelconque des revendications 21 à 23 et les mammifères transgéniques non-humains
25 selon la revendication 24, pour l'étude des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G.

26°) Utilisation d'un produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, les molécules d'acides nucléiques selon la revendication 16, les vecteurs recombinants selon la
30 revendication 19 ou la revendication 20, les cellules modifiées selon l'une quelconque des revendications 21 à 23 et les mammifères transgéniques non-humains selon la

revendication 24 pour le criblage d'agonistes et/ou d'antagonistes des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G.

27°) Utilisation d'un produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, les molécules d'acides nucléiques selon la revendication 16, les vecteurs recombinants selon la revendication 19 ou la revendication 20, les cellules modifiées selon l'une quelconque des revendications 21 à 23 et les mammifères transgéniques non-humains selon la revendication 24 pour le criblage d'antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 et β des canaux calciques haut-seuil.

10 28°) Méthode d'étude des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins les étapes suivantes :

a₁) la culture de cellules modifiées exprimant une protéine chimérique issue d'un canal calcique sensible aux protéines G et un récepteur couplé au protéine G selon la revendication 23,

b₁) la transduction d'un signal par l'intermédiaire dudit récepteur couplé aux protéine G, par tout moyen approprié, et

c₁) la détermination, par tout moyen approprié, de la proportion de ladite protéine chimérique exprimée dans lesdites cellules qui est liée à une sous-unité $G\beta\gamma$.

29°) Méthode de criblage d'agonistes/d'antagonistes des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins les étapes suivantes :

a₂) la culture de cellules modifiées exprimant une protéine chimérique issue d'un canal calcique sensible aux protéines G et un récepteur couplé au protéine G selon la revendication 23,

b₂) la transduction d'un signal par l'intermédiaire dudit récepteur couplé aux protéine G, par tout moyen approprié,

c₂) la détermination comparative, par tout moyen approprié, de la proportion de ladite protéine chimérique exprimée dans les cellules qui est liée à une sous-unité $G\beta\gamma$, avant et après la mise contact desdites cellules en b₂) avec une molécule à tester, et

revendication 24 pour le criblage d'agonistes et/ou d'antagonistes des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G.

27°) Utilisation d'un produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, les molécules d'acides nucléiques selon la revendication 16, les vecteurs recombinants selon la revendication 19 ou la revendication 20, les cellules modifiées selon l'une quelconque des revendications 21 à 23 et les mammifères transgéniques non-humains selon la revendication 24 pour le criblage d'antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 -et β des canaux calciques haut-seuil.

10 28°) Méthode d'étude des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins les étapes suivantes :

- a₁) la culture de cellules modifiées exprimant une protéine chimérique issue d'un canal calcique sensible aux protéines G et un récepteur couplé au protéine G selon la revendication 23,
- 15 b₁) la transduction d'un signal par l'intermédiaire dudit récepteur couplé aux protéine G, par tout moyen approprié, et
- c₁) la détermination, par tout moyen approprié, de la proportion de ladite protéine chimérique exprimée dans lesdites cellules qui est liée à une sous-unité G $\beta\gamma$.
- 20

29°) Méthode de criblage d'agonistes/d'antagonistes des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins les étapes suivantes :

- a₂) la culture de cellules modifiées exprimant une protéine chimérique issue d'un canal calcique sensible aux protéines G et un récepteur couplé aux protéines G selon la revendication 23,
- 25 b₂) la transduction d'un signal par l'intermédiaire dudit récepteur couplé aux protéine G, par tout moyen approprié,
- c₂) la détermination comparative, par tout moyen approprié, de la proportion de ladite protéine chimérique exprimée dans les cellules qui est liée à une
- 30

d₂) l'identification des molécules agonistes/antagonistes des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G détermination, correspondant à celles capables respectivement d'augmenter et de diminuer la concentration cellulaire en sous-unités G $\beta\gamma$ libres.

5 30°) Méthode selon la revendication 28 ou la revendication 29, caractérisée en ce que lesdites cellules modifiées en a₁) ou en a₂) expriment une protéine chimérique couplée, à ses extrémités NH₂ et COOH, respectivement à un fluorophore donneur et un fluorophore accepteur de fluorescence et ladite détermination en c₁) ou en c₂) est effectuée par la technique de transfert de
10 fluorescence (FRET).

31°) Méthode de criblage d'antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 et β des canaux calciques haut-seuil, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins les étapes suivantes :

a₃) la mise en contact d'une molécule à tester avec une protéine
15 chimérique issue d'un canal calcique sensible ou insensible aux protéines G selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, et avec un peptide comprenant le domaine AID d'une sous-unité α_1 insensible aux protéines G,

b₃) la mesure, par tout moyen approprié, de la liaison de ladite protéine chimérique audit peptide, et

20 c₃) l'identification des antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 et β , correspondant à ceux avec lesquels on observe une liaison de ladite protéine chimérique audit peptide.

32°) Méthode de criblage selon la revendication 31, caractérisée en ce que ledit peptide comprenant le domaine AID est immobilisé sur un support solide et
25 ladite protéine chimérique est une protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 11 à 14.

33°) Trousse pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 28 à 32, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques selon
30 l'une quelconque des revendications 1 à 14, les molécules d'acides nucléiques selon la revendication 16, les vecteurs recombinants selon la revendication 19 ou la

sous-unité $G\beta\gamma$, avant et après la mise en contact desdites cellules en b_2) avec une molécule à tester, et

d_2) l'identification des molécules agonistes/antagonistes des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux

5 protéines G_i , correspondant à celles capables respectivement d'augmenter et de diminuer la concentration cellulaire en sous-unités $G\beta\gamma$ libres.

30°) Méthode selon la revendication 28 ou la revendication 29, caractérisée en ce que lesdites cellules modifiées en a_1) ou en a_2) expriment une

protéine chimérique couplée, à ses extrémités NH_2 et $COOH$, respectivement à un

10 fluorophore donneur et un fluorophore accepteur de fluorescence et ladite détermination en c_1) ou en c_2) est effectuée par la technique de transfert de fluorescence (FRET).

31°) Méthode de criblage d'antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 et β des canaux calciques haut-seuil, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins les étapes suivantes :

15 a_3) la mise en contact d'une molécule à tester avec une protéine chimérique issue d'un canal calcique sensible ou insensible aux protéines G selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, et avec un peptide comprenant le domaine AID d'une sous-unité α_1 insensible aux protéines G ,

20 b_3) la mesure, par tout moyen approprié, de la liaison de ladite protéine chimérique audit peptide, et

c_3) l'identification des antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 et β , correspondant à ceux avec lesquels on observe une liaison de ladite protéine chimérique audit peptide.

25 32°) Méthode de criblage selon la revendication 31, caractérisée en ce que ledit peptide comprenant le domaine AID est immobilisé sur un support solide et ladite protéine chimérique est une protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 11 à 13.

30 33°) Trousse pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 28 à 32, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, les molécules d'acides nucléiques selon la

revendication 20, les cellules modifiées selon l'une quelconque des revendications 21 à 23 et les mammifères transgéniques non-humains selon la revendication 24.

revendication 16, les vecteurs recombinants selon la revendication 19 ou la revendication 20, les cellules modifiées selon l'une quelconque des revendications 21 à 23 et les mammifères transgéniques non-humains selon la revendication 24.

1/13

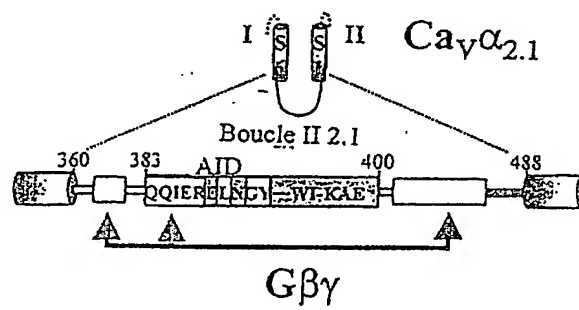


Figure 1

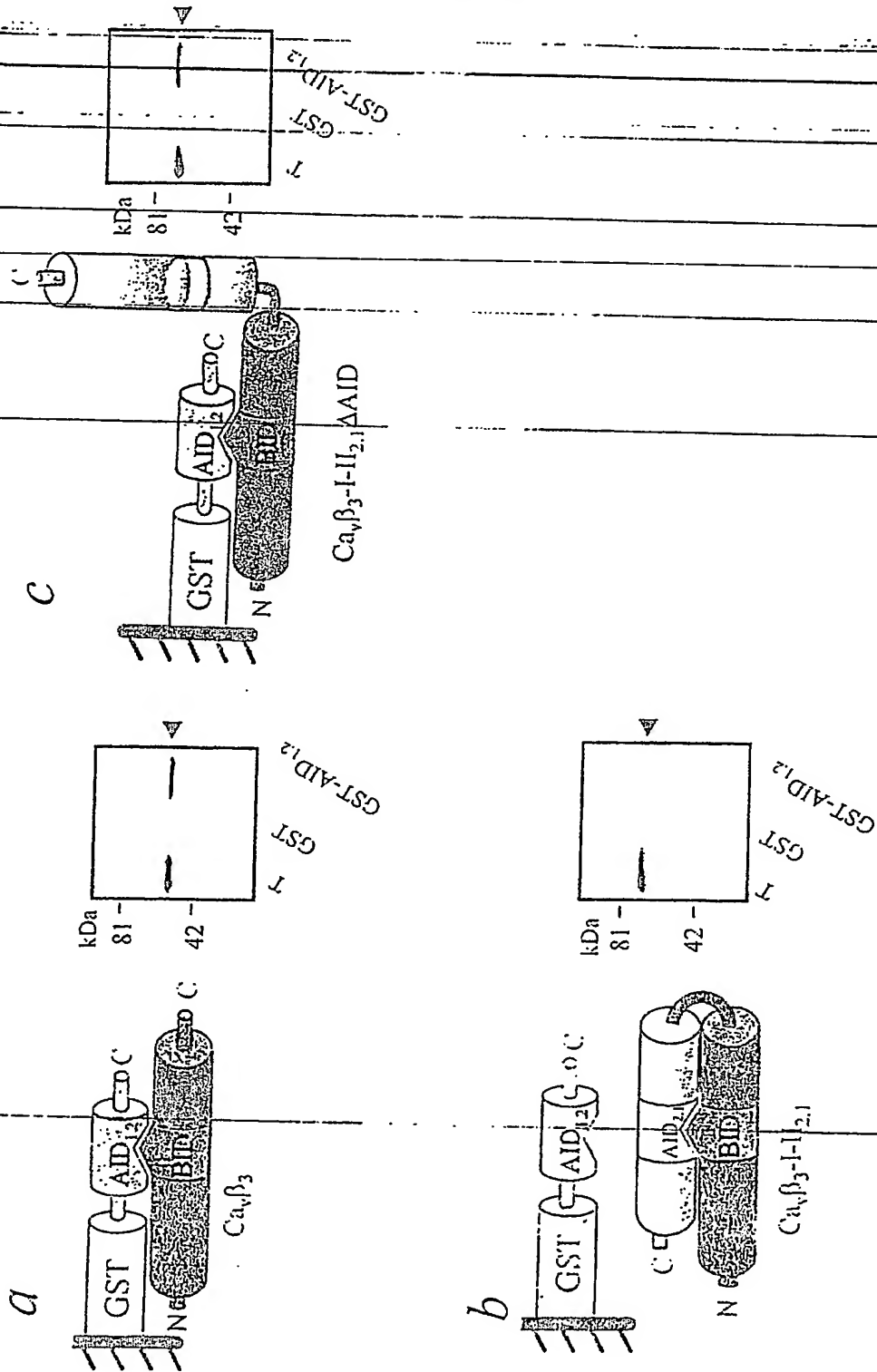


Figure 2

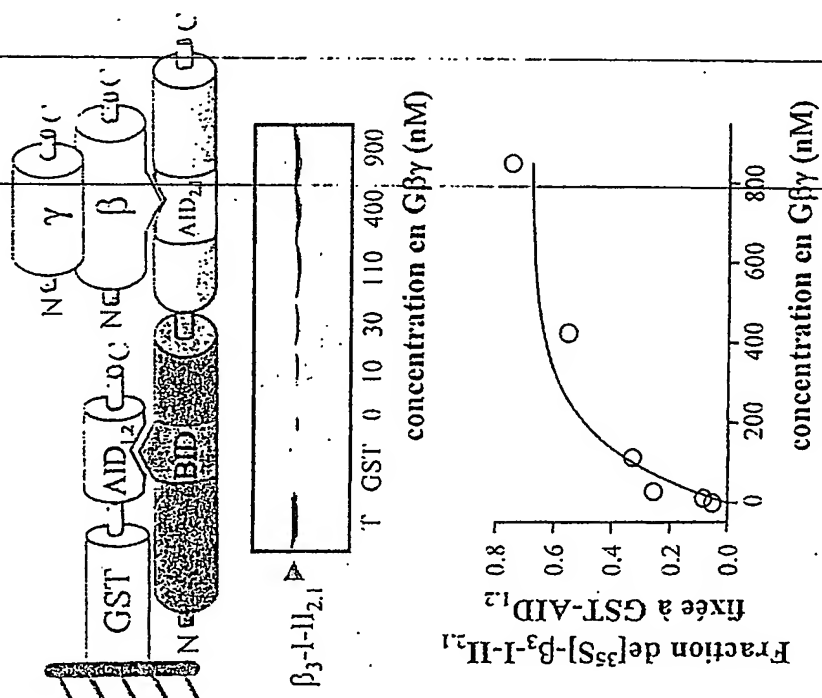


Figure 3

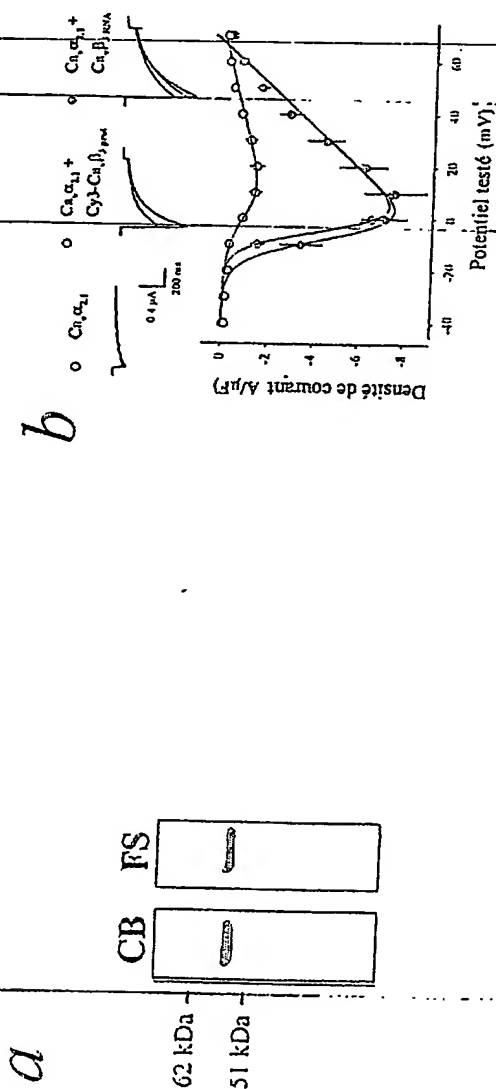


Figure 4

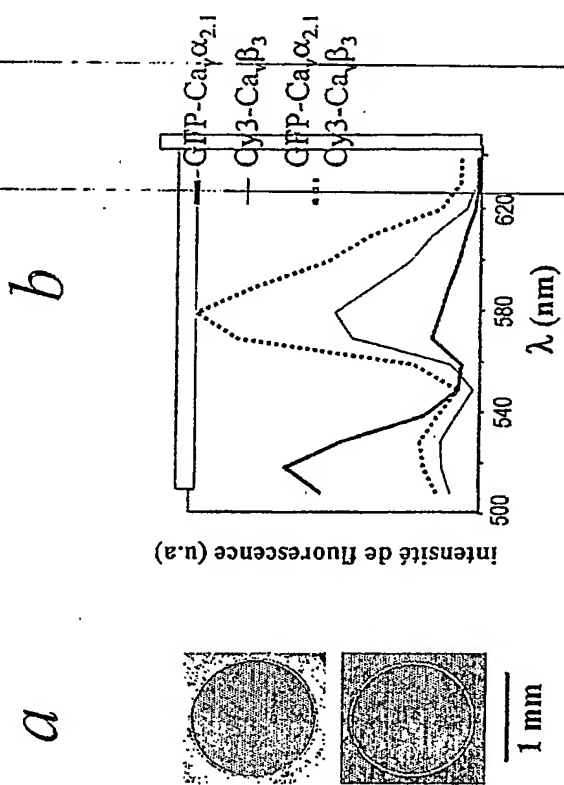


Figure 5

6/13

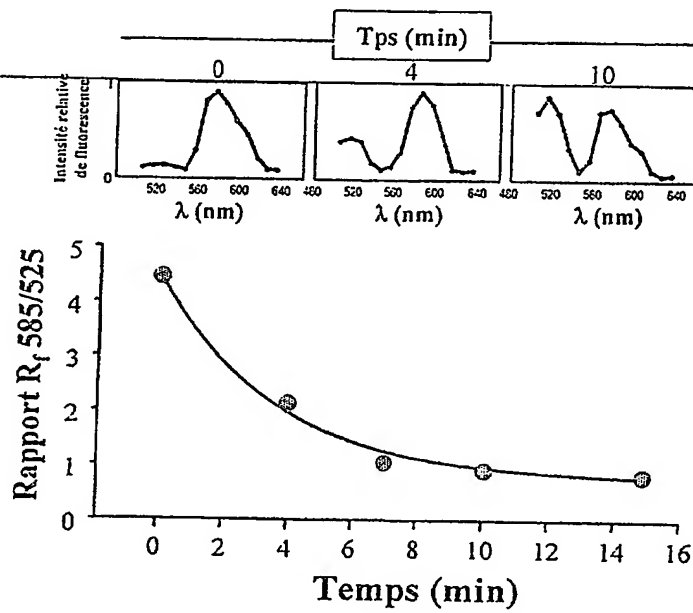


Figure 6

7/13

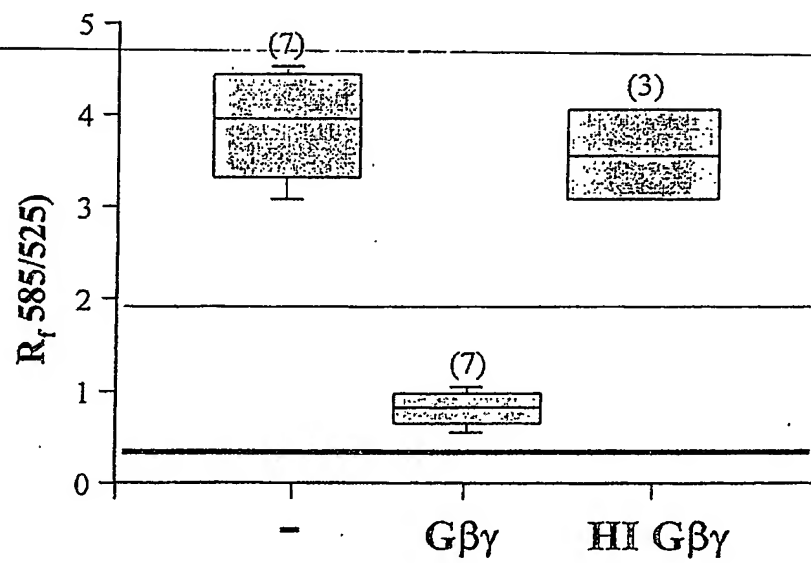


Figure 7

pcDNA3-Ca β 3-I-II2.1 (SEQ ID NO: 5)

```

1 ATGGATGACG ACTCCTACGT GCCCGGGTTT GAGGACTCGG AGGCGGGTTC
51 AGCCGACTCC TACACCAGCC GCCCGTCTGT GGACTCAGAC GTTTCCTGG
101 AGGAGGACCG GGAGAGTGCC CGGCGAGAAG TGGAGAGTCA GGCTCAGCAG
151 CAGCTGGAAA GAGCCAAGCA CAAACCTGTG GCATTTGCTG TGAGGACCAA
201 TGTCAGCTAC TGTGGAGTTC TGGATGAGGA ATGCCAGTC CAGGGCTCTG
251 GAGTCAAETT CGAGGCCAAA GATTTTCTGG ACATTAAAGA GAAGTACAGC
301 AATGACTGGT GGATCGGGAG GCTAGTGAAG GAAGGTGGCG ATATTGCCCTT
351 CATCCCAGC CCCAACGCC TGGAGAGCAT CCGGCTCAAA CAGGAACAGA
401 AGGCCAGGAG ATCCGGGAC CCTTCCAGCC TGAGTGACAT TGGCAACCGA
451 CGTTCCCCCTC CTCCATCTCT AGCCAAGCAG AAGCAAAAGC AGGCGGAACA
501 TGTCCTCCCTC TATGATGTGG TGCCCTGCAAT GGGGCTGTG GTGCTGGTGG
551 GACCTCTCTT GAAAGGTAT GAGGTCACAG ACATGATGCA GAAGGCTCTC
601 TTEGACTTCC TTAAACAGAG GTTTGATGGG AGGATGTCCA TCACCCGCGT
651 CACGGCTGAC CTCTCACTGG CCAAGCGCTC TGTGCTCAAC AATCCTGGCA
701 AGAGGACCAT CATCGAGCGC TCTTCTGCCC GCTCCAGCAT TGCTGAGGTG
751 CAGAGTGAGA TTGAGCGCAT ATTGAGCTG GCCAAATCCC TGCAGCTAGT
801 GGTGTTGGAT GCTGACACCA TCAACCACCC AGCACAGCTA GCCAAGACCT
851 CACTGGCCCC CATCATCGTC TTCGTCAAAG TGTCTCGCC AAAGGTACTG
901 CAGCGACTGA TCCGCTCCAG GGGGAAGTCC CAGATGAAGC ACCTCACTGT
951 ACAGATGATG GCATATGATA AGCTGGTTCA GTGCCACCT GAGTCATTTG
1001 ATGTGATTCT GGATGAGAAC CAGCTGGACG ACGCCTGTGA GCACCTAGCT
1051 GAATACCTAG AGGTTTACTG GCGCGCTACC CACCACCCAG CACCGGGCCC
1101 CGGGATGCTG GGTCCGCCCA GTGCCATCCC TGGACTTCAG AACCAGCAGC
1151 TGCTGGGGGA GCGAGGTGAG GAGCATTAC CCCTGGAGCG GGACAGTTTG
1201 ATGCCCTCGG ATGAGGCCAG TGAGAGCTCC CGCCAGGCCT GGACCGGATC
1251 TTCACAGCGC AGCTCCCGCC ATCTGGAGGA GGACTATGCA GATGCCTACC
1301 AGGACCTGTA CCAGCCTCAC CGTCAACACA CCTCGGGGCT ACCCAGTGCT
1351 AACGGGCATG ACCCCCAAGA CCGGCTCCTA GCCCAGGACT CGGAGCATGA
1401 CCACAATGAC CGGAAGTGGC AGCGTAACCG GCCTTGGCCT AAGGACAGCT
1451 ACGAATTGCG CAAAGAAAGG GAGCGGTGG AGAACGGCG CGCATTCCTG
1501 AAGCTGCGGC GGCAGCAGCA GATTGAACGC GAGCTCAACG GGTACATGGA
1551 GTGGATCTCA AAAGCAGAAG AGGTGATCCT CGCAGAGGAC GAGACCGACG
1601 TGGAGCAGAG ACATCCCTTT GATGGAGCTC TGCGGAGAGC CACTATCAAG
1651 AAGAGCAAGA CGGACCTGCT CCACCCAGAG GAGGCGGAGG ATCAGCTGGC
1701 CGACATCGCC TCCGTGGGGT CTCCCTTTGC CCGAGCCAGC ATTAAAGTG
1751 CCAAGCTGGA GAACTCGAGT TTTTCCACA AAAAAGAGAG GAGAATGCGT
1801 TTCTACATCC GTCGATGGT CAAAACTCAG TAAGAAATCT GCAGATATCC
1851 ATCACACTGG CGGCCGCTCG AGCATGCATC TAGAGGGCCC TATTCTATAG
1901 TGTCACCTAA ATGCTAGAGC TCGCTGATCA GCCTCGACTG TGCCTTCTAG
1951 TTGCCAGCCA TCTGTTGTTT GCCCTCCCC CGTGCTTCC TTGACCTGG
2001 AAGGTGCCAC TCCCACTGTC CTTTCCTAAT AAAATGAGGA AATTGCATCG
2051 CATTGTCTGA GTAGGTGTCA TTCTATTCTG GGGGTGGGG TGGGGCAGGA
2101 CAGCAAGGGG GAGGATGGG AAGACAATAG CAGGCATGCT GGGGATGCGG
2151 TGGGCTCTAT GGCCTCTGAG GCGGAAAGAA CCAGCTGGGG CTCTAGGGGG
2201 TATGGGCAGG CCCCCGTAG CGGCGCATTA AGCGCGGCGG GTGTGGTGGT
2251 TACGCGCAGC GTGACCGCTA CACTTGCCAG CGCCCTAGCG CCGCTCCTT
2301 TCGCTTTCTT CCCTTCCTTT CTCGCCACGT TCGCCGGCTT TCCCCGTCAA
2351 GCTCTAAATC GGGGCATCCC TTAGGGTTC CGATTTAGTG CTTTACGGCA
2401 CCTCGACCCC AAAAACTTG ATTAGGGTGA TGTTTACGT AGTGGCCAT
2451 CGCCCTGATA GACGGTTTTT CGCCCTTTGA CGTTGGAGTC CACGTTCTTT
2501 AATAGTGGAC TCTGTTCCTA AACTGGAACA AACTCAACC CTATCTCGGT
2551 CTATTCTTTT GATTATAAG GGATTTTGGG GATTTGGCC TATTGGTTAA
2601 AAAATGAGCT GATTAAACAA AAATTTAACG CGAATTAATT CTGTGGAATG
2651 TGTGTCAGTT AGGGTGTGGA AAGTCCCCAG GCTCCCCAGG CAGGCAGAAG
2701 TATGCAAAGC ATGCATCTCA ATTAGTCAGC AACCAGGTGT GGAAAGTCCC

```

Figure 8a

2751 CAGGCTEECG AGGAGGCAGA AGTATGCAAA GCATGCATCT CAATTAGTCA
 2801 GCAACCATAG TCCCGCCCTT AACTCEGCEE ATGECGCECC TAACTCGGCC
 2851 CAGTTCCGCC CATTCTCCGC CCCATGGCTG ACTAATTTTT TTTATTTATG
 2901 CAGAGSEEGA GSEEGCTGT GGGTGTGAGC TATTCCAGAA GTAGTGAGGA
 2951 GGCTTTTTTG GAGGCCTAGG CTTTTCGAAA AAGCTCCCGG GAGCTTGTAT
 3001 ATCCATTTTC GGATCTGATC AAGAGACAGG ATGAGGATCG TTTCGCATGA
 3051 TTGAACAAGA TGGATTGCAC GCAGGTTCTC CGGCCGCTTG GGTGCAGAGG
 3101 CTATTTCGGCT ATGACTGGGC ACAACAGACA ATCGGCTGCT CTGATGCCGC
 3151 CGTGTTCCGG CTGTACGCGC AGGGGCGCCC GGTTCTTTTT CTCAGACCCG
 3201 ACCTGTCCGG TGCCCTGAAT GAACTGCAGG ACGAGGCAGC GCGGCTATCG
 3251 TGGCTGGCCA CGACGGGCGT TCCTTGCGCA GCTGTGCTEG AGGTTGTGAG
 3301 TGAAGCGGGA AGGGACTGGC TGCTATTGGG CGAAGTGCCG GGGCAGGATC
 3351 TCCTGTCAAT TCACCTTGCT CCGTCCGAGA AAGTATCCAT CATGGCTGAT
 3401 GCAATGCCGC GGCTGCATAC GCTTGATCCG GCTACCTGCC CATTGCACCA
 3451 CCAAGCGAAA CATCGCATCG AGCGAGCAGC TACTCGGATG GAAGCCGGTC
 3501 TTGTTCGATCA GGATGATCTG GACGAAGAGC ATCAGGGGCT CGCAGACCCG
 3551 GAACTGTTTCG CCAGGCTCAA GGCGCGCATG CCCGACGGCG AGGATCTCGT
 3601 CGTGACCCAT GGCGATGCCT GCTTGCCGAA TATCATGGTG GAAAATGGCC
 3651 GCTTTTCTGG ATTCAATCGAC TGTGGCCGGC TGGGTGTGGC GGACCGCTAT
 3701 CAGGACATAG CGTTGGCTAC CCGTGATATT GCTGAAGAGC TTGGCGGGCA
 3751 ATGGGCTGAC CGCTTCCTCG TGCTTTACGG TATCGCCGCT CCCGATTCCG
 3801 AGCGCATCGC CTCTATCGC CTTCTTGACG AGTTCTTCTG AGCGGGACTC
 3851 TGGGGTTTGA AATGACCGAC CAAGCGACGC CCAACCTGCC ATCAGGAGAT
 3901 TTCGATTCCA CCGCCGCCTT CTATGAAAGG TTGGGCTTCG GAATCGTTTT
 3951 CCGGGACGCC GGCTGGATGA TCCTCCAGCG CGGGGATCTC ATGCTGGAGT
 4001 TCTTCGCCCC CCCCAACTTG TTTATTGCAG CTTATAATGG TTACAAATAA
 4051 AGCAATAGCA TCACAAATTT CACAAATAAA GCATTTTTTT CACTGCATTTC
 4101 TAGTTGTGGT TTGTCCAAAC TCATCAATGT ATCTTATCAT GTCTGTATAC
 4151 CGTCGACCTC TAGCTAGAGC TTGGCGTAAT CATGGTCATA GCTGTTTCCT
 4201 GTGTGAAATT GTTATCCGCT CACAATTCCA CACAACATAC GAGCCGGAAG
 4251 CATAAAGTGT AAAGCCTGGG GTGCCTAATG AGTGAGCTAA CTCACATTAA
 4301 TTGCGTTGCG CTCACTGCCC GCTTTCCAGT CGGGAAACCT GTCGTGCCAG
 4351 CTGCATTAAAT GAATCGGCCA ACGCGCGGGG AGAGGCGGTT TCGTATTGG
 4401 GCGCTCTTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG GTCGTTCCGG
 4451 TGCGGCGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG GTTATCCACA
 4501 GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG GCCAGCAAAA
 4551 GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GGCGTTTTTC CATAGGCTCC
 4601 GCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA GAGGTGGCGA
 4651 AAGCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG GAAGCTCCCT
 4701 CGTGCCTCTT CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC CTGTCCGCTT
 4751 TTCTCCCTTC GGAAGCGTG GCGCTTCTC AATGCTCAGC CTGTAGGTAT
 4801 CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG TGCACGAACC
 4851 CCCCCTTCAG CCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACATC CGTCTTGAGT
 4901 CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC CACTGGTAAC
 4951 AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT TCTTGAAGTG
 5001 GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT ATCTGCGCTC
 5051 TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC TTGATCCGGC
 5101 AAACAAACCA CCGCTGGTAG CGGTGGTTTT TTTGTTTGCA AGCAGCAGAT
 5151 TACGCGCAGA AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC TTTTCTACGG
 5201 GGTCTGACGC TCAGTGAAC GAAACTCAC GTTAAGGGAT TTTGGTCATG
 5251 AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAAT AAAAATGAAG
 5301 TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT GACAGTTACC
 5351 AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT ATTTCTGTTCA
 5401 TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACACGA TACGGGAGGG
 5451 CTTACCATCT GGCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCGCGAGAC CCACGCTCAC
 5501 CCGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG GGCCGAGCGC

Figure 8b

10/13

5551 AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCCTCC ATCCAGTCTA TTAATTGTTG
5601 CCGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG CGCAACGTTG
5651 TTGCCATTGC TACAGGCATC GTGGTGTAC GCTCGTCGTT TGGTATGGCT
5701 TCATTCTAGCT CCGGTTCCCA ACCATCAAGG CGAGTTAGAT CATGCCCCAT
5751 GTTGTGCTAA AAGCGGCTTA GCTCCTTCGG TCCTCCGATC GTTGTCAGAA
5801 GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC ACTGCATAAT
5851 TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA CTGGTGAGTA
5901 CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGCGACCG AGTTGCTCTT
5951 GCGGCGGCTC AATACGGGAT AATACCGCGC CACATAGCAG AACTTTAAAA
6001 GTGCTCATCA TTGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAACTCT CAAGGATCTT
6051 ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA CCAACTGAT
6101 CTTCAGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC AAAAACAGGA
6151 AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGAATAAGG GCGACACGGA AATGTTGAAT
6201 ACTCATACTC TTCCTTTTTC AATATTATTG AAGCATTAT CAGGGTTATT
6251 GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA TAAACAATA
6301 GGGGTTCCGC GCACATTTCC CCGAAAAGTG CCACCTGACG TCGACGGATC
6351 GGGAGATCTC CCGATCCCCCT ATGGTGCAGT CTCAGTACAA TCTGCTCTGA
6401 TGCCGCATAG TTAAGCCAGT ATCTGCTCCC TGCTTGTGTG TTGGAGGTCG
6451 CTGAGTAGTG CCGGAGEAAA ATTTAAGCTA CAACAAGGCA AGGCTTGACC
6501 GACAATTGCA TGAAGAATCT GCTTAGGGTT AGGCGTTTTG CGCTGCTTCG
6551 CGATGTACGG GCCAGATATA CGCGTTGACA TTGATTATTG ACTAGTTATT
6601 AATAGTAATC AATTACGGGG TCATTAGTTC ATAGCCCAT TATGGAGTTC
6651 CGCGTTACAT AACTTACGGT AAATGGCCCG CCTGGCTGAC CGCCCAACGA
6701 CCCCCGCCCA TTGACGTCAA TAATGACGTA TGTTCCCAT GTAACGCCAA
6751 TAGGGACTTT CCATTGACGT CAATGGGTGG ACTATTTACG GTAACTGCC
6801 CACTTGGCAG TACATCAAGT GTATCATATG CCAAGTACGC CCCCTATTGA
6851 CGTCAATGAC GGTAAATGGC CCGCCTGGCA TTATGCCAG TACATGACCT
6901 TATGGGACTT TCCTACTTGG CAGTACATCT ACGTATTAGT CATCGCTATT
6951 ACCATGGTGA TGCGGTTTTG GCAGTACATC AATGGGCGTG GATAGCGGTT
7001 TGA CTCACGG GGATTTCCAA GTCTCCACCC CATTGACGTC AATGGGAGTT
7051 TGTTTTGGCA CCAAATCAA CGGGACTTTC CAAAATGTCG TAACAACTCC
7101 GCCCCATTGA CGCAAATGGG CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGTCTATAT
7151 AAGCAGAGCT CTCTGGCTAA CTAGAGAACC CACTGCTTAC TGGCTTATCG
7201 AAATTAATAC GACTCACTAT AGGGAGACCC AAGCTTGGA CC

Figure 8c

pCHIC (SEQ ID NO: 10)

```

1 ATGCTGTGCT GTATGAGAAG AACCAACAG GTTGAAAAGA ATGATGAGGA
51 CCAAAAGATC ATGGTGAGCA AGGGCGAGGA GCTGTTTACC GGGGTGGTGC
101 CCATCCTGGT CGAGCTGGAC GCGGACGTAA ACGGCCACAA GTTCAGGGTG
151 TCCGGCGAGG GCGAGGGCGA TGGCAGCTAG GCGAAGCTGA CCTGAAGTT
201 CATCTGCACC ACCGGCAAGC TGCCCGTGCC CTGGCCCACC CTCGTGACCA
251 CCTTCGGCTA CCGCCTGCAG TGCTTCGCCC GCTACCCCGA CCACATGAAG
301 CAGCAGGACT TCTTCAAGTC CGCCATGCCC GAAGGCTACG TCCAGGAGCG
351 CACCATCTTC TTCAAGGACG ACGGCAACTA CAAGACCCGC GCCGAGGTGA
401 AGTTCGAGGG CGACACCCTG GTGAACCGCA TCGAGCTGAA GGGCATCGAC
451 TTCAAGGAGG ACGGCAACAT CCTGGGGCAC AAGCTGGAGT ACAACTACAA
501 CAGCCACAAC GTCTATATCA TGGCCGACAA GCAGAAGAAC GGCATCAAGG
551 TGAACCTCAA GATCCGCCAC AACATCGAGG ACGGCAGCGT GCAGCTCGCC
601 GACCACTACC AGCAGAACAC CCCCATCGGC GACGGCCCCG TCGTGTGCC
651 CGACAACCAC TACCTGAGCT ACCAGTCCGC CCTGAGCAAA GACCCCAACG
701 AGAAGCGCGA TCACATGGTC CTGCTGGAGT TCGTGACCGC CGCCGGGATC
751 ACTCTCGGCA TGGACGAGCT GTACGCGATC GCATCTCTAG CCAAGCAGAA
801 GCAAAAGCAG GCGGAACATG TCCCCCGTA TGATGTGGTG CCCTCCATGC
851 GGCTGTGGT GCTGGTGGGA CCTCTCTGA AAGGTTATGA GGTCAAGAC
901 ATGATGCAGA AGGCTCTCTT CGACTTCCTT AAACACAGGT TTGATGGCAG
951 GATCTCCATC ACCCGCGTCA CGGCTGACCT CTCACTGGCC AAGCGCTCTG
1001 TGCTCAACAA TCCTGGCAAG AGGACCATCA TCGAGCGCTC TTCTGCCCGC
1051 TCCAGCATTG CTGAGGTGCA GAGTGAGATT GAGCGCATAT TCGAGCTGGC
1101 CAAATCCCTG CAGCTAGTGG TGTTGGATGC TGACACCATC AACCACCCAG
1151 CACAGCTAGC CAAGACCTCA CTGGCCCCCA TCATCGTCTT CGTCAAAGTG
1201 TCCTCGCCAA AGGTACTGCA GCGACTGATC CGCTCCAGGG GGAAGTCCCA
1251 GATGAAGCAC CTCACTGTAC AGATGATGGC ATATGATAAG CTGGTTCAGT
1301 GCCCACCTGA GTCATTTGAT GTGATTCTGG ATGAGAACCA GCTGGACGAC
1351 GCCTGTGAGC ACCTAGCTGA ATACCTAGAG GTTTACTGGC GCGCTACCCA
1401 CCACCCAGCA CCGGGCCCCG GGATGCTGGG TCCGCCCAGT GCCATCCCTG
1451 GACTTCAGAA CCAGCAGCTG CTGGGGGAGC GAGGTGAGGA GCATTACCC
1501 CTGGAGCGGG ACAGTTTGAT GCCCTCGGAT GAGGCCAGTG AGAGCTCCCC
1551 CCAGGCCTGG ACCGGATCTT CACAGCGCAG CTCCCGCCAT CTGGAGGAGG
1601 ACTATGCAGA TGCCTACCAG GACCTGTACC AGCCTCACC TCACACACC
1651 TCGGGGCTAC CCAGTGCTAA CGGGCATGAC CCCCAGACC GGCTCCTAGC
1701 CCAGGACTCG GAGCATGACC ACAATGACCG GAACTGGCAG CGTAACCGGC
1751 CTTGGCCTAA GGACAGCTAC GAATTCGCCA AAGAAAGGGA GCGGGTGGAG
1801 AACC GGCGCG CATTCCTGAA GCTGCGGCGG CAGCAGCAGA TTGAACGCGA
1851 GCTCAACGGG TACATGGAGT GGATCTCAA ACCAGAAGAG GTGATCCCTG
1901 CAGAGGACGA GACCGACGTG GAGCAGAGAC ATCCCTTTGA TGGAGCTCTG
1951 CGGAGAGCCA CTATCAAGAA GAGCAAGACG GACCTGCTCC ACCCAGAGGA
2001 GGCGGAGGAT CAGCTGGCCG ACATCGCCTC CGTGGGGTCT CCCTTTGCCC
2051 GAGCCAGCAT TAAAAGTGCC AAGCTGGAGA ACTCGAGTTT TTTCCACAA
2101 AAAGAGAGGA GAATGCGTTT CTACATCCGT CGCATGGTCA AAACTCAGAC
2151 TAGTATGGTG AGCAAGGGCG AGGAGCTGTT CACCGGGGTG GTGCCATCC
2201 TGGTCCGAGCT GGACGGCGAC GTAAACGGCC ACAGGTTTCA CGTGTCCGGC
2251 GAGGGCGAGG GCGATGCCAC CTACGGCAAG CTGACCCTGA AGTTCATCTG
2301 CACCACCGGC AAGCTGCCCG TGCCCTGGCC CACCTCGTG ACCACCTGA
2351 CCTGGGGCGT CAGCTGCTTC AGCCGTAAG GCGACCATAT GAAGCAGCAC
2401 GACTTCTTCA AGTCCGCCAT GCGCGAAGG TACGTCCAGG AGCGACCAT
2451 CTTCTTCAAG GACGACGGCA ACTACAAGAC CCGCGCCGAG GTGAAGTTCTG
2501 AGGGCGACAC CCTGGTGAAC CGCATCGAGC TGAAGGGCAT CGACTTCAAG
2551 GAGGACGGCA ACATCTGGG GCACAAGCTG GAGTACAAC ATATCAGCCA
2601 CAACGTCTAT ATCACCGCCG ACAAGCAGAA GAACGGCATC AAGGCCAACT
2651 TCAAGATCCG CCACAACATC GAGGACGGCA GCGTGACAGT CGCCGACCAC
2701 TACCAGCAGA ACACCCCAT CCGGACGGC CCCGTGCTGC TGCCCGACAA

```

Figure 9a

2751 CCACTACCTG AGCACCEAGT CCGEEETGAG-~~CAAAGAGCGG~~-AAGGAGAAGC
 2801 GCGATCACAT GGTCTGCTG GAGTTCGTGA CCGCCGCCGG GATCACTCTC
 2851 GGCAGTTAAC TTGTTTATTG CAGCTTATAA TGGTTACAAA TAAAGCAATA
 2901 GCATCACAAA TTTCACAAAT-AAAGCAATTTT-TTTCAGTGA-TTCTAGTTGT
 2951 ~~GTTTGTGGA~~-~~AAGTCATCA~~-TGTATCTTAA GCGGTAAATT GTAAGCGTTA
 3001 ATATTTTGT AAAATTGCGG TTAATTTTT GTTAAATCAG CTCATTTTTT
 3051 AACC AATAGG CCGAAATCGG-~~CAAAATCGGT~~-TATAAATCAA AAGAATAGAC
 3101 CGAGATAGGG TTGAGTGTG TTCCAGTTTG GAACAAGAGT CCACTATTAA
 3151 AGAACGTGGA CTCCAACGTC AAAGGGCGAA AAACCGTCTA TCAGGGCGAT
 3201 GGCCCACTAC GTGAACCATC ACCCTAATCA AGTTTTTTGG GGTCGAGGTG
 3251 CCGTAAAGCA CTAAATCGGA ACCCTAAAGG GAGCCCCCGA TTTAGAGCTT
 3301 ~~GACGGGGAAA~~ GCGGCGGAAC GTGGCGAGAA AGGAAGGGAA GAAAGCGAAA
 3351 GGAGCGGGCG CTAGGGCGCT GGCAAGTGTA GCGGTCACGC TGCGGTAAAC
 3401 ~~CACCACACCC~~ GCGGCGCTTA ATGCGCGCT ACAGGGCGCG TCAGGTGGCA
 3451 CTTTTCGGGG AAATGTGCGC GGAACCCCTA TTTGTTTATT TTTCTAAATA
 3501 CATTCAAATA TGTATCCGCT CATGAGACAA TAACCCTGAT AAATGCTTCA
 3551 ATAATATTGA AAAAGGAAGA GTCCTGAGGC GGAAAGAACC AGCTGTGGAA
 3601 TGTGTGTCAG TTAGGGTGTG GAAAGTCCCC AGGCTCCCCA GCAGGCAGAA
 3651 ~~GATGCAAAAG~~ ~~CATGGATCTC~~ ~~AATTAGTCAG~~ ~~CAACCAGGTG~~ TGGAAAGTCC
 3701 CCAGGCTCCC CAGCAGGCAG AAGTATGCAA AGCATGCATC TCAATTAGTC
 3751 AGCAACCATA GTCCCGCCCC TAACTCCGCC CATCCCGCCC CTAACCTCCG
 3801 CCAGTTCCGC CCATTCTCCG CCCCATGGCT GACTAATTTT TTTTATTAT
 3851 GCAGAGGCCG AGGCCGCCCTC GGCTCTGAG CTATTCCAGA AGTAGTGAGG
 3901 AGGCTTTTTT GGAGGCCTAG GCTTTTGCAA AGATCGATCA AGAGACAGGA
 3951 TGAGGATCGT TTCGCATGAT TGAACAAGAT GGATTGCACG CAGGTTCTCC
 4001 GGCCGCTTGG GTGGAGAGGC TATTCGGCTA TGACTGGGCA CAACAGACAA
 4051 TCGGCTGCTC TGATGCCGCC GTGTCCGGC TGTCAGCGCA GGGGCGCCCG
 4101 GTTCTTTTTG TCAAGACCGA CCTGTCCGGT GCCCTGAATG AACTGCAAGA
 4151 CGAGGCAGCG CGGCTATCGT GGCTGGCCAC GACGGGCGTT CTAACCTCCG
 4201 CTGTGCTCGA CGTTGTCACT GAAGCGGGAA GGGACTGGCT GCTATTGGG
 4251 GAAGTGCCGG GGCAGGATCT CCTGTCTATC CACCTTGCTC CTGCCGAGAA
 4301 AGTATCCATC ATGGCTGATG CAATGCGGCG GCTGCATACG CTTGATCCGG
 4351 CTACCTGCCC ATTCGACCAC CAAGCGAAAC ATCGCATCGA GCGAGCACGT
 4401 ACTCGGATGG AAGCCGGTCT TGTCGATCAG GATGATCTGG ACGAAGAGCA
 4451 TCAGGGGCTC GCGCCAGCCG AACTGTTGCG CAGGCTCAAG GCGAGCATGC
 4501 CCGACGGCGA GGATCTCGTC GTGACCCATG GCGATGCCCTG CTTGCCGAAT
 4551 ATCATGGTGG AAAATGGCCG CTTTTCTGGA TTCATCGACT TTGGCCGGCT
 4601 GGGTGTGGCG GACCGCTATC AGGACATAGC GTTGGCTACC CGTGATATTG
 4651 CTGAAGAGCT TGGCGGCGAA TGGGCTGACC GCTTCCTCGT GCTTTACGGT
 4701 ATCGCCGCTC CCGATTGCGA GCGCATCGCC TTCTATCGCC TTCTTGACGA
 4751 GTTCTTCTGA GCGGGACTCT GGGGTTCGAA ATGACCGACC AAGCGACGCC
 4801 CAACCTGCCA TCACGAGATT TCGATTCCAC CGCCGCCCTC TATGAAAGGT
 4851 TGGGCTTCGG AATCGTTTTT CCGGACGCCG GCTGGATGAT CCTCCAGCGC
 4901 GGGGATCTCA TGCTGGAGTT CTTGCCCCAC CTTAGGGGGA GGCTAACTGA
 4951 AACACGGAAG GAGACAATAC CGGAAGGAAC CCGCGCTATG ACGGCAATAA
 5001 AAAGACAGAA TAAACGCGAC GGTGTTGGGT CGTTTGTTCA TAAACGCGGG
 5051 GTTCGGTCCC AGGGCTGGCA CTCGTCTGAT ACCCCACCGA GACCCCATTTG
 5101 GGGCCAATAC GCGCGGCTTT CTTCCTTTTC CCCACCCAC CCCCCAAGTT
 5151 CGGGTGAAGG CCCAGGGCTC GCAGCCAACG TCGGGGCGGC AGGCCCTGCC
 5201 ATAGCCTCAG GTTACTATA TAACTTTAG ATTGATTAA AACTTCATTT
 5251 TTAATTTAAA AGGATCTAGG TGAAGATCCT TTTTGATAAT CTCATGACCA
 5301 AAATCCCTTA ACGTGAGTTT TCGTTCCACT GAGCGTCAGA CCGGTAGAA
 5351 AAGATCAAAG GATCTTCTTG AGATCCTTTT TTTCTGCGCG TAATCTGCTG
 5401 CTTGCAACA AAAAAACCAC CGCTACCAGC GGTGGTTTGT TTGCCGGATC
 5451 AAGAGCTACC AACTCTTTT CCGAAGGTAA CTGGCTTCAG CAGAGCGCAG
 5501 ATACCAAATA CTGTCCTTCT AGTGTAGCCG TAGTTAGGCC ACCACTTCAA

Figure 9b

5551 GAACTCTGTA GCACGGCGCTA CATACCTGGG TGTGCTAATC CTGTTACCAG
 5601 TGGCTGCTGC CAGTGCCGAT AAGTCCTGTC TTACCGGGTT GGACTCAAGA
 5651 CGATAGTTAC CGGATAAGGC GCAGCGGTGC GGCTGAACGG GGGGTTTCGTG
 5701 CACACAGCCC AGCTTGGAGC CAACGAGCTA CAGGGAACTG AGATACCTAC
 5751 AGCGTGAAGT ATGAGAAAGC GCCACGCTTC CCGAAGGGAG AAAGGCGGAC
 5801 AGGTATCCGG TAAGCGGCAG GGTCCGAACA GGAGAGCGCA CGAGGGAGCT
 5851 TCCAGGGGGA AACGCCTGGT ATCTTTATAG TCGTGTGGG TTTCGCCACC
 5901 TCTGACTTGA GCGTCCGATT TTGTGATGCT CGTCAGGGGG GCGGAGCCTA
 5951 TGGAAAAACG CCAGCAACGC GGCCTTTTAA CGGTTCCCTGG CCTTTTGCTG
 6001 GCCTTTTGCT CACATGTTCT TTCCTGCGTT ATCCCCTGAT TCTGTGGATA
 6051 ACGGTATTAC EGCCATGCAT TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC
 6101 ATTAGTTCAT AGCCCATATA TGGAGTTCCG CGTTACATAA CTTACGGTAA
 6151 ATGGCCCGCC TGGCTGACCG CCAACGACC CCCGCCATT GACGTCAATA
 6201 ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC ATTGACGTCA
 6251 ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAAGTGCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT
 6301 ATCATATGCC AAGTACGCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC
 6351 GCCTGGCATT ATGCCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA
 6401 GTACATCTAC GTATTAGTCA TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC
 6451 AGTACATCAA TGGGCGTGGA TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT
 6501 CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG
 6551 GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG
 6601 GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATA GCAGAGCTGG TTTAGTGAAC
 6651 CGTCAGATCC GCTAGCGCTA CCGGACTCAG ATCTCGAGCT CAAGCTTCGA
 6701 ATTCTGCAGT CGACGGTACC GCGGGCCCGG GATCCACCGG TCGCCACC

Figure 9c

267-87-SEQ.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> CEA

INSERM

<120> PROTEINE CHIMERIQUE POUR LE CRIBLAGE D'AGONISTES ET D'ANTAGONISTES
DES VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRES DEPENDANTES DES RECEPTEURS
COUPLES AUX PROTEINES G

<130> BLO/HLPm1F263/87FR

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 58

<212> DNA

<213> séquence artificielle

<220>

<223> amorce PCR

<400> 1

tttggtacca tggatgacga ctctacgtg cccgggtttg aggactcgga ggcggggtt 58

<210> 2

<211> 48

<212> DNA

<213> séquence artificielle

<220>

<223> amorce PCR

<400> 2

gcggaattcg tagctgtcct taggccaagg ccggttacgc tgccagtt 48

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> séquence artificielle

<220>

<223> amorce PCR

<400> 3

ggggaattcg ccaaagaaag ggagcgggtg gagaac

36

<210> 4

<211> 51

<212> DNA

<213> séquence artificielle

<220>

<223> amorce PCR

<400> 4

tttgaattct tactgagttt tgaccatgcy acggatgtag aaacgcattc t

51

<210> 5

<211> 7242

<212> DNA

<213> séquence artificielle

<220>

<223> plasmide pCDNA3Cavb3-I-II2.1

<400> 5

atggatgacg actcctacgt gcccggttt gaggactcgg aggcgggttc agccgactcc 60

tacaccagcc gccctctctt ggactcagac gtttccctgg aggaggaccg ggagagtgcc 120

cggcgagaag tggagagtca ggctcagcag cagctggaaa gagccaagca caaacctgtg 180

gcatttgctg tgaggaccaa tgtcagctac tgtggagttc tggatgagga atgcccagtc 240

cagggtctg gagtcaactt cgaggccaaa gattttctgc acattaaaga gaagtacagc 300

aatgactggt ggatcgggag gctagtgaag gaagggtggc atattgcctt catccccagc 360

ccccaaagcc tggagagcat ccggctcaaa caggaacaga aggccaggag atccgggaac 420

ccttcagcc tgagtgcacat tggcaaccga cgttccccct ctccatctct agccaagcag 480

| | |
|--|------|
| aagcaaaagc aggcggaaca tgtcccccg tatgatgtgg tgccctccat gcggcctgtg | 540 |
| gtgctgggtg gaccctctct gaaagggttat gaggtcacag acatgatgca gaaggctctc | 600 |
| ttcgacttcc ttaaacacag gtttgatggc aggatctcca tcacccgctt caccgctgac | 660 |
| ctctcactgg ccaagcgctc tgtgctcaac aatcctggca agaggaccat catcgagcgc | 720 |
| tcttctgccc gctccagcat tgctgaggtg cagagtgaga ttgagcgcat attcgagctg | 780 |
| gccaaatccc tgcagctagt ggtgttggat gctgacacca tcaaccaccc agcacagcta | 840 |
| gccaaagacct cactggcccc catcatcgtc ttctgcaaaag tgcctcgc aaaggtactg | 900 |
| cagcgactga tccgctccag ggggaagtcc cagatgaagc acctcactgt acagatgatg | 960 |
| gcatatgata agctgggttca gtgcccacct gagtcatttg atgtgattct ggatgagaac | 1020 |
| cagctggacg acgcctgtga gcacctagct gaatacctag aggtttactg gcgcgctacc | 1080 |
| caccaccag caccgggccc cgggatgctg ggtccgccc gtgcatccc tggacttcag | 1140 |
| aaccagcagc tgctggggga gcgaggtgag gagcattcac ccttgagcgc ggacagtttg | 1200 |
| atgccctcgg atgaggccag tgagagctcc cgccaggcct ggaccggatc ttcacagcgc | 1260 |
| agctcccgcc atctggagga ggactatgca gatgcctacc aggacctgta ccagcctcac | 1320 |
| cgtaacaca cctcggggct acccagtgtt aacgggcatg accccaaga ccggctccta | 1380 |
| gcccaggact cggagcatga ccacaatgac cggaactggc agcgtaaccc gccttggcct | 1440 |
| aaggacagct acgaattcgc caaagaaagg gagcgggtgg agaaccggcg cgcattcctg | 1500 |
| aagctgcggc ggcagcagca gattgaacgc gagctcaacg ggtacatgga gtggatctca | 1560 |
| aaagcagaag aggtgatcct cgcagaggac gagaccgacg tggagcagag acatcccttt | 1620 |
| gatggagctc tgcggagagc cactatcaag aagagcaaga cggacctgct ccaccagag | 1680 |
| gaggcggagg atcagctggc cgacatcgcc tccgtggggt ctccctttgc ccgagccagc | 1740 |
| attaaaagtg ccaagctgga gaactcgagt tttttccaca aaaaagagag gagaatgcgt | 1800 |
| ttctacatcc gtcgcatggt caaaactcag taagaattct gcagatatcc atcacactgg | 1860 |
| cggccgctcg agcatgcac tagaggggcc tattctatag tgtcacctaa atgctagagc | 1920 |
| tcgctgatca gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt gccctcccc | 1980 |
| cgtgccttcc ttgacctgg aaggtgccac tcccactgtc ctttcctaataaaaatgagga | 2040 |
| aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tgggagcagga | 2100 |
| cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat | 2160 |
| ggcttctgag gcggaagaa ccagctgggg ctctaggggg tatccccacg cgccctgtag | 2220 |
| cggcgcatga agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag | 2280 |
| cgccctagcg cccgctcctt tcgctttctt ccttcctt ctcgccagct tcgcccgtt | 2340 |
| tccccgtcaa gctctaaatc ggggcatccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca | 2400 |
| cctcgacccc aaaaaacttg attaggggtga tggttcacgt agtgggcat cgccctgata | 2460 |
| gacggttttt cgcccttga cgttgagtc caggttctt aatagtggac tctgttcca | 2520 |

267-87-SEQ.ST25

| | |
|--|------|
| aactggaaca acactcaacc ctatctcggg ctattctttt gatttataag ggatttttggg | 2580 |
| gatttcggcc tatttggttaa aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaatttaatt | 2640 |
| ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtcctccag gctcccccagg caggcagaag | 2700 |
| tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccaggtgt ggaaagtccc caggctcccc | 2760 |
| agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct caattagtcg gcaaccatag tcccggccct | 2820 |
| aactccgccc atcccgcccc taactccgcc cagttccgcc cattctccgc ccatgggctg | 2880 |
| actaattttt tttatttatg cagaggccga ggccgcctct gctcttgagc tattccagaa | 2940 |
| gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg cttttgcaaa aagctcccgagg gactgtgtat | 3000 |
| atccattttt ggatctgac aagagacagg atgaggatcg ttctgcatga ttgaacaaga | 3060 |
| tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc | 3120 |
| acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttcggg ctgtcagcgc aggggcgccc | 3180 |
| ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc | 3240 |
| gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgctac | 3300 |
| tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc | 3360 |
| tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac | 3420 |
| gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcacg | 3480 |
| tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct | 3540 |
| cgcgccagcc gaactgttcg ccagggtcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt | 3600 |
| cgtgacctat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatgggtg gaaaatggcc gcttttctgg | 3660 |
| attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggttac | 3720 |
| ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg | 3780 |
| tatcgccgct cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg | 3840 |
| agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat | 3900 |
| ttcgattcca ccgccgctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc | 3960 |
| ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgccc ccccaacttg | 4020 |
| ttcattcgag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa | 4080 |
| gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcacaaatgt atcttatcat | 4140 |
| gtctgtatac cgtcgacctc tagctagagc ttggcgtaat catgggtcata gctgtttcct | 4200 |
| gtctgcaatt gttatccgct cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt | 4260 |
| aaagcctggg gtgcctaatt agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc | 4320 |
| gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg | 4380 |
| agaggcggtt tgcgtattgg gcgctcttc gttcctcgc tctactgactc gctgcgctcg | 4440 |
| gtctgcaatg tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca | 4500 |
| gaatcgaggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac | 4560 |

267-87-SEQ.ST25

| | |
|---|------|
| cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac | 4620 |
| aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcagag gactataaag ataccaggcg | 4680 |
| tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgtttccga cctgcccgtt taccggatac | 4740 |
| ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggtat | 4800 |
| ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag | 4860 |
| cccgaccgct gcgccttata cggttaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac | 4920 |
| ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgfaggcggt | 4980 |
| gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtattttggt | 5040 |
| atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc | 5100 |
| aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga | 5160 |
| aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac | 5220 |
| gaaaactcac gttaagggat tttgggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc | 5280 |
| cttttaaat aaatatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttgggtct | 5340 |
| gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca | 5400 |
| tccatagttg cctgactccc cgctcgttag ataactacga tacggggaggg cttaccatct | 5460 |
| ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca | 5520 |
| ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc | 5580 |
| atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg | 5640 |
| cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc gtgggtgtcac gctcgtcgtt tggtaggct | 5700 |
| tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa | 5760 |
| aaagcggtta gtccttcggt tcctccgatc gttgtcagaa gtaagtggc cgcagtgta | 5820 |
| tcactcatgg ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc | 5880 |
| ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg | 5940 |
| agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa | 6000 |
| gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg | 6060 |
| agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc | 6120 |
| accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg | 6180 |
| gcgacacgga aatgttgaat actcatactc ttcctttttc aatattattg aagcatttat | 6240 |
| cagggttatt gtctcatgag cggatacata ttggaatgta tttagaaaaa taaacaata | 6300 |
| ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tcgacggatc gggagatctc | 6360 |
| ccgatccccct atggtcgtact ctcagtacaa tctgtcttga tgccgcatag ttaagccagt | 6420 |
| atctgctccc tgcttgtgtg ttggagggtc ctgagtagtg cgcgagcaaa atttaagcta | 6480 |
| caacaaggca aggcttgacc gacaattgca tgaagaatct gcttaggggt aggcgttttg | 6540 |
| cgctgcttcg cgatgtacgg gccagatata cgcgttgaca ttgattattg actagttatt | 6600 |

267-87-SEQ.ST25

aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat 6660

aacttacggt aaatggcccc cctggctgac cgcccaacga ccccgccca ttgacgtcaa 6720

taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg 6780

actatttacg gtaaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc 6840

ccccattga cgtcaatgac ggtaaatggc cgcctggca ttatgccag tacatgacct 6900

tatgggactt tcttacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatgggtga 6960

tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg ggatttccaa 7020

gtctccaccc cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca caaaatcaa cgggactttc 7080

caaaatgtcg taacaactcc gccccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacgggtggg 7140

aggcttatat aagcagagct ctctggctaa ctagagaacc cactgcttac tggcttatcg 7200

aaattaatac gactcactat agggagaccc aagcttggtg cc 7242

<210> 6

<211> 39

<212> DNA

<213> séquence artificielle

<220>

<223> amorce PCR

<400> 6

agccgtacgc gatcgcatct ctagccaagc agaagcaaa

39

<210> 7

<211> 42

<212> DNA

<213> séquence artificielle

<220>

<223> amorce PCR

<400> 7

cccgtaacc ccactagtct gagttttgac catgcgacgg at 42

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> séquence artificielle

<220>

<223> amorce PCR...

<400> 8

gggactagta tggtagagca gggcgaggag ctg 33

<210> 9

<211> 34

<212> DNA

<213> séquence artificielle

<220>

<223> amorce PCR

<400> 9

cccgttaact gccgagagtg atccccggcgg cggt 34

<210> 10

<211> 6748

<212> DNA

<213> séquence artificielle

<220>

<223> plasmide pCHIC (dérivé du vecteur pEYFPmemb)

<400> 10

atgctgtgct gtatgagaag aaccaaacag gttgaaaaga atgatgagga ccaaaagatc 60

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 120

ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 180

ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 240

ctcgtgacca ccttcggcta cggcctgcag tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag 300

cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 360

ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 420

gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 480

aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 540

ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 600

gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 660

267-87-SEQ.ST25

| | |
|---|-----------------|
| tacctgagct accagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcgga tcacatgggtc | 720 |
| etgctggagt tcgtgaccgc cgcggggate actctcggca tggacgagct gtacgcgac | 780 |
| gcattctctag ccaagcagaa gcaaaagcag gcggaacatg tccccccgta tgatgtggtg | 840 |
| ccctccatgc ggcctgtggt gctggtggga ccctctctga aaggttatga ggtcacagac | 900 |
| atgatgcaga aggetctctt cgacttctt aaacacaggt ttgatggcag gatctecac | 960 |
| acccgcgtca cggctgacct ctcaactggc aagcgctctg tgetcaacaa tcctggcaag | 1020 |
| aggaccatca tcgagcgtc ttctgcccgc tccagcattg ctgaggtgca gagtgcgatt | 1080 |
| gagcgcatat tcgagctggc caaatccctg cagctagtgg tgrtggatgc tgacaccatc | 1140 |
| aaccacccag cacagctagc caagacctca ctggccccca tcatcgtctt cgtcaaagt | 1200 |
| tcctcgccaa aggtactgca gcgactgac cgctccagg ggaagtccca gatgaagcac | 1260 |
| ctcactgtac agatgatggc atatgataag ctggttcagt gccacactga gtcatttgat | 1320 |
| gtgattctgg atgagaacca gctggacgac gcctgtgagc acctagctga atacctagag | 1380 |
| gtttactggc gcgctaacca ccacccagca ccgggccccg ggatgctggg tccgcccagt | 1440 |
| gccatccctg gacttcagaa ccagcagctg ctgggggagc gaggtgagga gcattcaccc | 1500 |
| ctggagcggg acagtttgat gccctcggat gaggccagtg agagctcccg ccaggcctgg | 1560 |
| accggatctt cacagcgag ctcccgccat ctggaggagg actatgcaga tgcctaccag | 1620 |
| gacctgtacc agcctcaccg tcaacacacc tcggggctac ccagtgctaa cgggcatgac | 1680 |
| ccccaagacc ggctcctagc ccaggactcg gagcatgacc acaatgaccg gaactggcag | 1740 |
| cgtaaccggc cttggcctaa ggacagctac gaattcgcca aagaaaggga gcgggtggag | 1800 |
| aaccggcgcg cattcctgaa gctgcggcg cagcagcaga ttgaacgcga gctcaacggg | 1860 |
| tacatggagt ggatctcaaa agcagaagag gtgatcctcg cagaggacga gaccgacgtg | 1920 |
| gagcagagac atccctttga tggagctctg cggagagcca ctatcaagaa gagcaagacg | 1980 |
| gacctgtcc acccagagga ggcggaggat cagctggccg acatcgctc cgtgggtct | 2040 |
| ccctttgccc gagccagcat taaaagtgcc aagctggaga actcgagttt tttccacaaa | 2100 |
| aaagagagga gaatgcgtt ctacatccgt cgcattgtca aaactcagac tagtatgggtg | 2160 |
| agcaagggcg aggagctgtt caccggggtg gtgcccaccc tggtcgagct ggacggcgac | 2220 |
| gtaaacggcc acaggttcag cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag | 2280 |
| ctgaccctga agttcatctg caccacggc aagctgcccg tgccctggcc caccctcgtg | 2340 |
| accaccctga cctggggcgt gcagtgttc agccgctacc ccgaccacat gaagcagcac | 2400 |
| gacttttca agtccgccat gccgaaggc tacgtccagg agcgaccat cttcttcaag | 2460 |
| gacgacggca actacaagac ccgcgccgag gtgaagtctg agggcgacac cctggtgaac | 2520 |
| cgcattcgagc tgaagggcat cgacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg | 2580 |
| gagtacaact atatcagcca caacgtctat atcaccgccg acaagcagaa gaacggcatc | 2640 |
| aaggccaact tcaagatccg ccacaacatc gaggacggc gcgtgcagct cgccgaccac | 2700 |

267-87-SEQ.ST25

| | |
|--|-----------------|
| taccagcaga acacccccat cggcgacggc cccgtgctgc tgcccagaaa ccactacctg | 2760 |
| agcaccacagt ccgcccctgag caaagacccc aaggagaagc gcgatcacat ggtcctgctg | 2820 |
| gagttcgtga ccgcccgcgg gatcactctc ggcagttaac ttgtttattg cagcttataa | 2880 |
| tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa ttccacaaat aaagcatttt ttccaactgca | 2940 |
| ttctagttgt ggtttgtcca aaeteatcaa tgtatettaa ggcgtaaatt gtaagcgta | 3000 |
| atattttgtt aaaattecgc ttaaattttt gttaaatcag ctcatTTTTT aaccaatagg | 3060 |
| ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa agaataagac cgagataggg ttgagtgttg | 3120 |
| ttccagtttg gaacaagagt ccactattaa agaactgtga ctccaacgtc aaagggcgaa | 3180 |
| aaaccgtcta tcagggcgat ggcctactac gtgaaccatc accctaata agtttttttg | 3240 |
| ggtcagaggtg ccgtaaagca ctaaatacga accctaaagg gagccccga tttagagctt | 3300 |
| gacggggaaa gccggcgaac gtggcgagaa aggaaggaa gaaagcgaaa ggagcgggcg | 3360 |
| ctagggcgct ggcaagtgtg gcggtcacgc tgcgcgtaac caccacaccc gccgcgctta | 3420 |
| atgcgccgt acagggcgcg tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgCgc ggaaccccta | 3480 |
| tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgt catgagaaa taaccctgat | 3540 |
| aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtcctgaggc ggaaagaacc agctgtggaa | 3600 |
| tgtgtgtcag ttaggggtgtg gaaagtcccc aggtccccca gcaggcagaa gtatgcaaag | 3660 |
| catgcatctc aattagtcag caaccaggtg tggaaagtcc ccaggctccc cagcaggcag | 3720 |
| aagtatgcaa agcatgcatc tcaattagtc agcaaccata gtcccgcccc taactccgcc | 3780 |
| catccccccc ctaactccgc ccagttccgc ccatttccgc ccccatggct gactaatttt | 3840 |
| ttttatttat gcagaggccg aggcgcctc ggcctctgag ctattccaga agtagtgagg | 3900 |
| aggctttttt ggaggcctag gcttttgcaa agatcgatca agagacagga tgaggatcgt | 3960 |
| ttcgcgatgat tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggccgcttg gtggagaggc | 4020 |
| tattcggcta tgaactggca caacagaaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc | 4080 |
| tgtcagcgca ggggcgccc gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg | 4140 |
| aactgcaaga cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac gacgggcgtt ccttgccgag | 4200 |
| ctgtgctcga cgttgtcact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgcgg | 4260 |
| ggcaggatct cctgtcatct cacttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg | 4320 |
| caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg ctacctgcc attcgaccac caagcgaaac | 4380 |
| atcgcacga gcgagcacgt actcggatgg aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg | 4440 |
| acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgagcatgc | 4500 |
| ccgacggcga ggatctcgtc gtgacccatg gcgatgctg cttgccgaat atcatgggtg | 4560 |
| aaaatggccg cttttctgga ttcactgact gtggccggct ggggtgtggcg gaccgctatc | 4620 |
| aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc | 4680 |
| gcttccctgt gctttacggt atcgccgctc ccgattcgca gcgcatcgcc ttctatcgcc | 4740 |

267-87-SEQ.ST25

| | |
|---|-----------------|
| ttcttgacga gttcttctga gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc | 4800 |
| caacctgcc tcacgagatt tcgattccac cgcgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg | 4860 |
| aatcgtttc cgggacgccg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt | 4920 |
| cttcgcccac cctaggggga ggctaactga aacacggaag gagacaatac cgaaggaac | 4980 |
| ccgcgctatg acggcaataa aaagacagaa taaaagcac gggtgttgggt cgtttgctca | 5040 |
| taaacgcggg gttcggtccc agggctggca ctctgtcgat acccccccga gaacccattg | 5100 |
| gggccaatac gccgcgttt cttccttttc cccacccac ccccaagtt cgggtgaagg | 5160 |
| cccagggctc gcagccaacg tcggggcggc aggccttgc atagcctcag gttactcata | 5220 |
| tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct | 5280 |
| ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gacgctcaga | 5340 |
| ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg | 5400 |
| cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc | 5460 |
| aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct | 5520 |
| agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgcta catacctcgc | 5580 |
| tctgctaatac ctgttaccag tggtctgctg cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccggggt | 5640 |
| ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg | 5700 |
| cacacagccc agcttgagc gaacgacctt caccgaactg agatacctac agcgtgagct | 5760 |
| atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag | 5820 |
| ggctcgyaaca ggagagcgca cgaggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag | 5880 |
| tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg | 5940 |
| gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ctttttctg | 6000 |
| gccttttctg cactgttct ttctgcgtt atcccctgat tctgtggata accgtattac | 6060 |
| cgccatgcat tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggc attagttcat agccatata | 6120 |
| tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc | 6180 |
| ccgcgcatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc | 6240 |
| atgagctca atgggtggag tatttacggg aaactgccca cttggcagta catcaagtgt | 6300 |
| atcatatgcc aagtagcccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt | 6360 |
| atgacgcta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca | 6420 |
| tctgtgctg catgggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg | 6480 |
| actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc | 6540 |
| aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg | 6600 |
| gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcagatcc | 6660 |
| gttagcgcta ccggactcag atctcgagct caagcttcga attctgcagt cgacgggtacc | 6720 |
| gcgggcccgg gatccaccgg tcgccacc | 6748 |

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04. Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../2...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

CS 113 0 W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)

BLO/HLPmIF263/87FR

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

02.16.576

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

PROTEINE CHIMÉRIQUE POUR LE CRIBLAGE D'AGONISTES ET D'ANTAGONISTES DES VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRES DEPENDANTES DES RECEPTEURS COUPLÉS AUX PRTEINES G

LE(S) DEMANDEUR(S) :

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

| | | |
|-------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Nom | DE WAARD |
| | Prénoms | Michel |
| Adresse | Rue | Lotissement du Frou |
| | Code postal et ville | 3 8 3 8 0 SAINT-CHRISTOPHE / GUIERS |
| Société d'appartenance (facultatif) | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Nom | DUPUIS |
| | Prénoms | Alain |
| Adresse | Rue | 35, rue C. Kogan |
| | Code postal et ville | 3 8 1 0 0 GRENOBLE |
| Société d'appartenance (facultatif) | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Nom | GRUNWALD |
| | Prénoms | Didier |
| Adresse | Rue | 3, rue des Brioux |
| | Code postal et ville | 3 8 1 2 0 SAINT EGREVE |
| Société d'appartenance (facultatif) | | |

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)

DU (DES) DEMANDEUR(S)

OU DU MANDATAIRE

(Nom et qualité du signataire)

23 DECEMBRE 2002

Béatrice ORES

(n°92-4046)



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11235*03

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2.. / 2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 3 N / 270501

Nos références pour ce dossier (facultatif)

BLO/HLPmIF263/87FR

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

0246576

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

PROTEINE CHIMÉRIQUE POUR LE CRIBLAGE D'AGONISTES ET D'ANTAGONISTES DES VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRES DÉPENDANTES DES RÉCEPTEURS COUPLES AUX PROTÉINES G

LE(S) DEMANDEUR(S) :

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

| | | |
|-------------------------------------|----------------------|-----------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Nom | SANDOZ |
| | Prénoms | Guillaume |
| Adresse | Rue | 11, rue Saint-Jacques |
| | Code postal et ville | 38000 GRENOBLE |
| Société d'appartenance (facultatif) | | |
| <input type="checkbox"/> | Nom | |
| | Prénoms | |
| Adresse | Rue | |
| | Code postal et ville | |
| Société d'appartenance (facultatif) | | |
| <input type="checkbox"/> | Nom | |
| | Prénoms | |
| Adresse | Rue | |
| | Code postal et ville | |
| Société d'appartenance (facultatif) | | |

Si y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)

DU (DES) DEMANDEUR(S)

OU DU MANDATAIRE

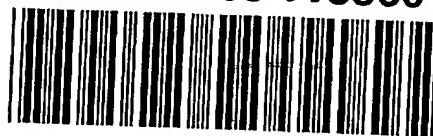
(Nom et qualité du signataire)

23 DECEMBRE 2002

Beatrice ORES

(n°92-4046)

PUT/FR2003/003860



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**